UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1952-1953 – N° 369

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE ET IMMUNOLOGIQUE DU « PLASMODIUM BERGHEI »

Travail effectué au Laboratoire de Zoologie et Parasitologie (Professeur R. SIGALAS) et au Laboratoire de Sérologie (Professeur P. JOULIA) de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux.

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « Pharmacie »

Présentée et soutenue publiquement le Mercredi 15 Avril 1953

PAR

NGUYEN-VINH-NIEN

Né à Cholon (Sud Viet-Nam), le 29 Novembre 1925.

DIPLÔMÉ DE SÉROLOGIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
CERTIFIÉ D'HÉMATOLOGIE ET DE COPROLOGIE
CERTIFIÉ D'OPTIQUE MÉDICALE

Examinateurs de la Thèse :

MM. SIGALAS, professeur ..... *Président*
GIRARD, professeur ..... *Juges*
PAUTRIZEL, maître de conférences agrégé .. *Juges*
MASQUELIER, maître de conférences agrégé . *Juges*

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE

1953

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1952-1953 – N° 369

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE ET IMMUNOLOGIQUE DU « PLASMODIUM BERGHEI »

Travail effectué au Laboratoire de Zoologie et Parasitologie (Professeur R. SIGALAS) et au Laboratoire de Sérologie (Professeur P. JOULIA) de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux.

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « Pharmacie »

Présentée et soutenue publiquement le Mercredi 15 Avril 1953

PAR

NGUYEN-VINH-NIEN

Né à Cholon (Sud Viet-Nam), le 29 Novembre 1925.

DIPLÔMÉ DE SÉROLOGIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
CERTIFIÉ D'HÉMATOLOGIE ET DE COPROLOGIE
CERTIFIÉ D'OPTIQUE MÉDICALE

Examinateurs de la Thèse :

MM. SIGALAS, professeur ..... *Président*
GIRARD, professeur .....
PAUTRIZEL, maître de conférences agrégé .. *Juges*
MASQUELIER, maître de conférences agrégé .

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE

1953

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPÉRIÉ, CHELLE.
DOYEN : M. PORTMANN. — **ASSESSEUR** : M. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, GUYOT, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PÉRY, LABAT, CHARRIER, DUBREUIL, MACHEBŒUF, CRUCHET.

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	CREYX / BROUSTET
Clinique chirurgicale	PAPIN / MASSÉ
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE
Clinique gynécologique	MAGENDIE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY
Anatomie	DUFOUR
Anatomie générale et histologie	MAYER
Hygiène et Clinique de la tuberculose	PIÉCHAUD
Médecine légale et médecine du travail	DERVILLÉE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale.	REBOUL
Chimie	MESNARD
Matière médicale	GOLSE
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clinique médicale des maladies des enfants.	FONTAN
Zoologie et parasitologie	SIGALAS

	MM.
Pathologie générale et expérimentale	SARIC
Clinique ophtalmologique.	BEAUVIEUX
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	POUYANNE
Clinique des maladies infectieuses	AUBERTIN
Chimie biologique et médicale	TAYEAU
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ
Botanique et cryptogamie	GIRARD
Thérapeutique	N...

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. PERRENS (Maladies mentales),
BLANQUET (Physique pharmaceutique).

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

	MM.
Parasitologie	PAUTRIZEL
Physiologie	Mlle ROUGIER
Bactériologie	MOUSTARDIER

	MM.
Pharmacie (1re Section)	R. GOLSE
Pharmacie (2e Section)	MASQUELIER
Pharmacie (3e Section)	CAZAUX

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Médecine générale	DUBARRY / F.-J.TRAISSAC / BERGOUIGNAN / LENG-LÉVY / N...
Chirurgie générale	LAUMONIER / CHAVANNAZ / N...
Obstétrique	MAHON / CHASTRUSSE

	MM.
Ophtalmologie	BESSIÈRE
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
Pédiatrie et puériculture	VERGER
Médecine légale et médecine du travail	L'ÉPÉE
Electro-radiologie	LACHAPÈLE
Odonto-stomatologie	N...
Urologie	LANGE

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	DUFOUR
Accouchements	CHASTRUSSE
Puériculture	VERGER / PÉRY
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI / COUSTOU
Anatomie	RIGAUD
Chimie minérale	R. GOLSE
Cryptogamie	LAUBIE

	MM.
Pharmacie galénique	MESNARD
Organographie et physiologie végétale	TEMPÈRE
Chimie biologique	NEUZIL
Chimie biologique analytique	MARQUEVIELLE
Chimie analytique	BABIN
Hygiène appliquée	QUILICHINI
Pathologie chirurgicale	LAUMONIER / VILLAR
Zoologie pharmaceutique	BAILENGER
Hydrologie pharmaceutique	CAZAUX

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MON PÈRE, A MA MÈRE

A MON ONCLE, LE DOCTEUR NGUYEN-VAN-BON

ET A MA TANTE

A MES FRÈRES ET SŒURS

A MES AMIS

A MONSIEUR LE-VAN-THOI

DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

CHEF DE LABORATOIRE A L'INSTITUT DU PIN DE BORDEAUX

A MONSIEUR LE PHARMACIEN-CAPITAINE P. ACKER

PHARMACIEN-CHEF A L'HÔPITAL DE PAPEETE (TAHITI)

ET A MADAME P. ACKER

A NOS MAITRES

DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

DE BORDEAUX

A NOS JUGES

MONSIEUR J. MASQUELIER

MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

DOCTEUR ÈS SCIENCES

MONSIEUR LE DOCTEUR R. PAUTRIZEL

MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

DOCTEUR ÈS SCIENCES

CHEF DE LABORATOIRE AU CENTRE DE PROPHYLAXIE ANTIVÉNÉRIENNE

CROIX DE GUERRE 1939-1945

OFFICIER D'ACADÉMIE

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. GIRARD

PROFESSEUR DE BOTANIQUE ET DE CRYPTOGAMIE

DIRECTEUR DE L'INSTITUT BOTANIQUE DE TALENCE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

OFFICIER DU MÉRITE AGRICOLE

OFFICIER DU MÉRITE TOURISTIQUE

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. SIGALAS

PROFESSEUR DE ZOOLOGIE ET PARASITOLOGIE

DIRECTEUR HONORAIRE DE LA STATION BIOLOGIQUE D'ARCACHON

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

AVANT-PROPOS

Nous ne saurions commencer l'exposé de ce travail sans témoigner notre reconnaissance envers tous ceux qui nous ont guidé et ont facilité notre tâche.

M. R. Canivenc, Assistant au Laboratoire d'Histologie, avec une amabilité jamais en défaut, a bien voulu nous faire profiter de son expérience en photographie. De même, M^lle^ M.-A. Sauvageau, Assistante au Laboratoire de Parasitologie, a sacrifié beaucoup de son temps pour nous initier aux délicates techniques de la micro-photographie. Nous tenons à les remercier bien sincèrement.

Nous remercions aussi M. J. Bailenger, Chef de Travaux Pratiques, Chargé de Cours, des conseils judicieux qu'il nous a donnés et de l'aide matérielle qu'il nous a apportée.

Nos remerciements s'adressent également à M. le Professeur F. Tayeau qui, avec sa bienveillance habituelle, nous a ouvert les portes de son Laboratoire et permis de chercher dans sa bibliothèque tout ce dont nous avions besoin; à MM. les Professeurs G. Mayer et R. Castagnou, dont l'accueil nous a vivement touché et qui ont bien voulu mettre à notre disposition tout l'appareillage de leur Laboratoire.

A M. le Professeur agrégé J. Masquelier, dont nous avons suivi l'enseignement avec le plus grand intérêt et qui nous honore de sa présence dans notre jury, nous voulons affirmer notre sincère reconnaissance.

Notre Maître, M. le Professeur agrégé R. Pautrizel, nous a guidé pas à pas dans l'accomplissement de cette thèse

dont il a été l'inspirateur, ne ménageant ni son temps, ni sa peine. Les précieux conseils qu'il nous a si aimablement et si largement prodigués ont aplani bien des difficultés. Puisse ce modeste travail ne pas décevoir la confiance qu'il a bien voulu placer en nous et lui apporter l'expression de notre très vive reconnaissance et de notre très respectueux attachement.

Nous nous honorons également de compter parmi nos juges M. le Professeur R. Girard qui a laissé chez tous ceux qui ont eu le privilège de suivre son enseignement magistral la plus profonde empreinte. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre gratitude respectueuse.

A notre Maître, M. le Professeur R. Sigalas, dont l'enseignement si clair et si précis a jeté les bases de nos connaissances en Parasitologie, nous devons une grande partie de notre formation scientifique. Par la suite, il nous a réservé l'accueil le plus aimable dans son Laboratoire, et s'est intéressé, avec une paternelle bienveillance, à toutes nos recherches.

Aujourd'hui, nous sommes heureux de pouvoir lui exprimer, en tant que Président de notre Jury de thèse, notre très profonde gratitude et notre immense reconnaissance.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE EXPÉRIMENTALE ET IMMUNOLOGIQUE DU « PLASMODIUM BERGHEI »

INTRODUCTION

La recherche directe au microscope de l'agent causal, le *Plasmodium,* découvert par Laveran en 1880, demeure bien entendu le critère de choix dans le diagnostic du paludisme.

Cependant, il arrive assez fréquemment que ce critère ne puisse pas être obtenu : c'est le cas du paludisme chronique, du paludisme latent, de certaines primo-invasions à *Plasmodium falciparum,* où les parasites se trouvent cantonnés plus volontiers dans les viscères.

D'autre part, l'emploi des médicaments antipaludéens peut chasser les parasites du sang périphérique, la maladie n'en persiste pas moins.

Aussi, depuis longtemps, de nombreux auteurs se sont-ils orientés vers un diagnostic sérologique.

Les premiers, Lo Monicho et Panichi [46] signalèrent que le sérum paludéen dilué au 1/5 avait la propriété d'agglutiner les hématies des paludéens (1901).

A leur tour, Abraham et Sévenet [1] expliquèrent la fin de l'accès palustre par l'apparition dans le sang de « schizontolysines » particulièrement actives à l'égard des schizontes (1917). Les rechutes seraient dues à l'atténuation ou à la disparition de ces substances lytiques.

Le pouvoir précipitant des sérums paludéens fut étudié par divers auteurs : Pewny [52], en 1918; Zieman [73], en

1924; Taliaferro [63], en 1927, avec des résultats douteux.

La sérologie du paludisme entra dans une nouvelle phase quand Henry proposa, en 1927, au Congrès pour l'Avancement des Sciences de Constantine [41], une épreuve sérologique qu'il prétendit spécifique, et basée sur le fait que les sérums paludéens, mis en présence de mélanine ou d'un sel de fer, floculaient.

D'autres auteurs attribuèrent cependant la floculation observée dans ces cas-là à un déséquilibre albumineux du sérum des paludéens, déséquilibre qu'on peut constater par simple addition d'eau distillée (réaction de Chorine [10]) ou objectiver par emploi d'indicateurs colorés comme le bleu de méthylène, la phénol-sulfone-phtaléine, la suspension de carmin et, surtout, le rouge Congo (réaction de Carlson [9]).

Ce ne fut que plus tard, vers 1938, que Coggeshall et Eaton [47] orientèrent les recherches vers une conception immunologique pure, mettant en jeu essentiellement une réaction antigène-anticorps basée sur la déviation du complément. Depuis, d'autres équipes de chercheurs : Dulaney et Stratman-Thomas [17], Lippincott et Gordon [45], Heidelberger et Mayer [40] ont adopté cette voie. Tous cherchèrent à préparer un réactif antigénique obtenu directement à partir de *Plasmodium*.

En réalité, le principe n'est pas nouveau : de Blasi [14], Massa [49], Gasparrini [38], Thomson [64], Horowitz-Wlassowa [42] se servaient déjà d'organes ou de sang humains infestés comme matériel antigénique, mais les résultats obtenus furent contradictoires.

La découverte, en 1948, d'un nouveau parasite, le *Plasmodium Berghei* [72], transmissible aux petits rongeurs (Rats, Souris), a permis d'espérer, qu'en dehors de son emploi pour l'essai de divers médicaments, cette souche pourrait être utilisée à des fins diagnostiques.

Le but de notre travail sera, dans une première partie, de rapporter notre expérimentation concernant le *Plasmo-*

dium Berghei sur le Rat blanc et la Souris blanche, en particulier les modifications qualitatives et quantitatives au cours de l'évolution de l'infection, les différents moyens pour augmenter la parasitémie, les variations de la virulence de la souche, les divers degrés immunitaires chez le Rat.

Cet état d'immunité partielle relève de facteurs humoraux que nous essaierons de déceler à partir d'un antigène obtenu aussi pur que possible. Sa préparation, les divers essais, les résultats obtenus constitueront l'objet de la seconde partie.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DU « PLASMODIUM BERGHEI »

HISTORIQUE

C'est en étudiant, aux environs d'Elizabethville (Congo belge), les mœurs de l'*Anopheles dureni,* que Vincke et Lips [72] observèrent que ce moustique ne s'éloignait pas de son gîte, ne se gorgeait pas de sang humain; pourtant, son index sporozoïtique était très élevé.

Les recherches systématiques effectuées chez les rongeurs leur permirent de trouver, en janvier 1948, chez deux *Thamnomys,* des parasites endoglobulaires sur la nature desquels aucun doute n'était possible. Comme il s'agissait d'une espèce nouvelle, ils lui donnèrent le nom de *Plasmodium Berghei* (*), en l'honneur de leur Maître, le Professeur Van den Berghe.

Les études ultérieures ont montré que les diverses espèces de rongeurs réceptifs sont, par ordre de sensibilité décroissante : la Souris blanche, le Rat blanc, le Rat noir, le *Thamnomys,* le Mérion, le Cotton Rat, la Roussette, le Lapin et le Cobaye : Vincke et Lips [72], Vincke et Bulcke [70, 71], Durand et Mathis [18, 19], Riel [55], Sergent [61], Galliard et Lapierre [37], Deschiens et Lamy [15], Rodhain [56].

(*) La souche de *Plasmodium Berghei* qui a servi à nos expériences nous a été obligeamment envoyée par le Docteur Lamy, de l'Institut Pasteur de Paris, que nous tenons à remercier ici.

TECHNIQUES D'ÉTUDE

Nous nous sommes servi, pour l'étude expérimentale du *Plasmodium Berghei,* de la Souris blanche et du Rat blanc, animaux de choix.

Comme nous le verrons plus loin (p. 26), les signes cliniques ne sont manifestes qu'au cours de la période aiguë. Cependant, l'évolution de la parasitémie peut être fidèlement suivie par examen du sang à des intervalles réguliers (en pratique tous les deux jours).

Le sang est prélevé à la queue ou aux pattes, et examiné selon l'une des techniques suivantes :

Examen microscopique

a) *Méthode panoptique de Pappenheim,* basée sur l'emploi successif du mélange de May-Grünwald et celui de Giemsa;

b) *Méthode de Giemsa :* fixation par l'alcool méthylique et coloration par le Giemsa;

c) *Examen en contraste de phase,* qui permet une étude rapide, à l'état frais, sans coloration. Il complète l'observation sur préparations colorées et fixées, et rend mieux compte de la mobilité du parasite, très marquée chez les formes jeunes et de division.

Il convient de noter, cependant, que le pluriparasitisme étant de règle dans l'infection à *Plasmodium Berghei,* des hématies polyparasitées pourront être prises pour des granulocytes, mais un entraînement suffisant permet d'éliminer cette cause d'erreur.

A l'autopsie

a) *Examen macroscopique* des viscères (surtout la rate et le foie), au double point de vue de la grosseur et de la couleur;

b) *Examen microscopique* de frottis de ces organes.

Inoculation a un sujet neuf de sang du sujet en expérience

Cette inoculation permet de déceler une infection latente ou de déterminer le degré de virulence du sang.

DIFFÉRENTES VOIES D'INOCULATION

Voie intrapéritonéale

C'est la plus efficace pour l'entretien de la souche [26].

Ainsi que l'ont démontré Cunningham, Hahn et Mc Kee [13], la séreuse péritonéale est facilement traversée par les hématies, de sorte que les *Plasmodium* arrivent indirectement, mais assez rapidement dans le sang circulant.

On peut, à cet effet, à l'aide d'une pipette Pasteur, prélever quelques gouttes de sang infesté qu'on insuffle dans le péritoine d'une Souris neuve (ou d'un Rat neuf). Ou bien, si on veut inoculer un nombre voulu d'hématozoaires, on opère selon la technique suivante préconisée par Fabiani et Vargues [27] :

« Un Giemsa préalable ayant établi le pourcentage d'hématies parasitées, on prélève quelques gouttes de sang du même animal donneur qu'on dilue dans du liquide de Ringer. Une numération, à l'aide d'une cellule de Malassez, indique le nombre d'hématies par mm^3 de suspension. On procède alors aux dilutions avec le même liquide, pour avoir, dans un volume connu, par exemple un cm^3, le nombre de parasites que l'on désire inoculer. »

Il convient, d'autre part, pour obtenir une infestation rapide et régulière, de mélanger les sangs de plusieurs Souris très infestées (50 p. 100 ou plus) auxquels on ajoute un égal volume de citrate à 2 p. 100. Nous avons constaté, en effet, qu'à nombre égal de parasites injectés, en partant de donneurs différents, les résultats ne sont pas toujours superposables.

Voie intracardiaque

La technique est assez délicate et à déconseiller chez la Souris, dont le cœur est de très faible volume, et on risque de piquer à côté.

Au contraire, chez le Rat, avec un peu d'habitude, on arrive aisément, de la façon suivante : après avoir endormi l'animal, on le fixe par quatre grosses épingles plantées dans les pattes, sur un plateau de liège, face ventrale en dessus. On enfonce l'aiguille, qui doit être fine (5/10es de mm. de diamètre, 2 cm. de longueur), à un point situé à 7 ou 8 mm. au-dessus de l'angle formé par la base de l'appendice xiphoïde et le dernier cartilage costal attaché au sternum; on s'assure, par aspiration du piston, qu'on se trouve bien dans l'une des cavités du cœur, puis on refoule lentement la dilution de sang parasité en réaspirant de temps en temps pour s'assurer que l'on n'a pas quitté la cavité cardiaque. La pointe de l'aiguille doit être parfaitement intacte pour ne pas léser le myocarde.

Autres voies d'inoculation

Elles peuvent réaliser aussi une infection :

— *Voie oculaire :* chambre antérieure de l'œil;

— *Voie respiratoire :* dépôt de sang infesté sur les orifices nasaux.

Quant aux voies sous-cutanée et intradermique, l'infection conférée est inconstante [26].

Nous indiquons ici les significations des différentes abréviations employées par la suite :

I. P. : voie intrapéritonéale;
I. M. : voie intramusculaire;
I. V. : voie intraveineuse;
B.-M. : bain-marie;
t° : température;

mn. : minutes;
G. R. P. : globules rouges parasités;
+ : présence rare;
Pl. : Plasmodium;
θ : mort spontanée;
M. : millions.

CHAPITRE PREMIER

LA PÉRIODE PRÉPATENTE

Ce terme, préconisé par James [43], sert à désigner le temps qui s'écoule entre l'introduction du parasite et son apparition dans le sang périphérique. Il est préférable à celui de *période d'incubation* qui a plutôt un sens clinique.

Les expériences que nous avons faites ont montré que cette période augmente d'une façon générale, en même temps que l'ancienneté de l'infection du donneur de sang, c'est-à-dire en même temps que diminue le nombre de *Plasmodium* inoculés. De plus, elle varie énormément avec la voie d'introduction et dépend aussi de la résistance individuelle des animaux en expérience.

En général, la période prépatente est nulle par voie intracardiaque [27]. Par voie intrapéritonéale, nous avons obtenu les résultats suivants portant sur 110 Souris et 225 Rats :

	Souris	Rats
1er jour	17	4
2e —	43	53
3e —	28	107
4e —	19	35
5e —	2	20
6e —	1	3
7e —	»	2
8e —	»	1
	Durée moyenne : 2 jours.	Durée moyenne : 3 jours.

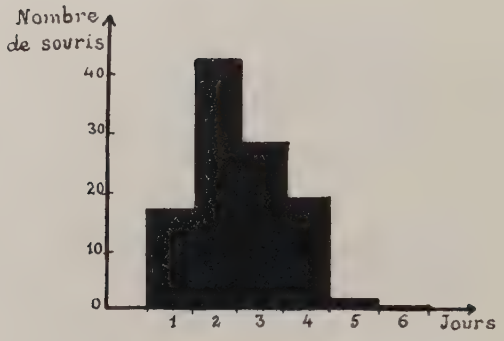

FIG. 1.

Graphique représentant la durée de la période prépatente chez la Souris.
(Expérience portant sur 110 animaux.)

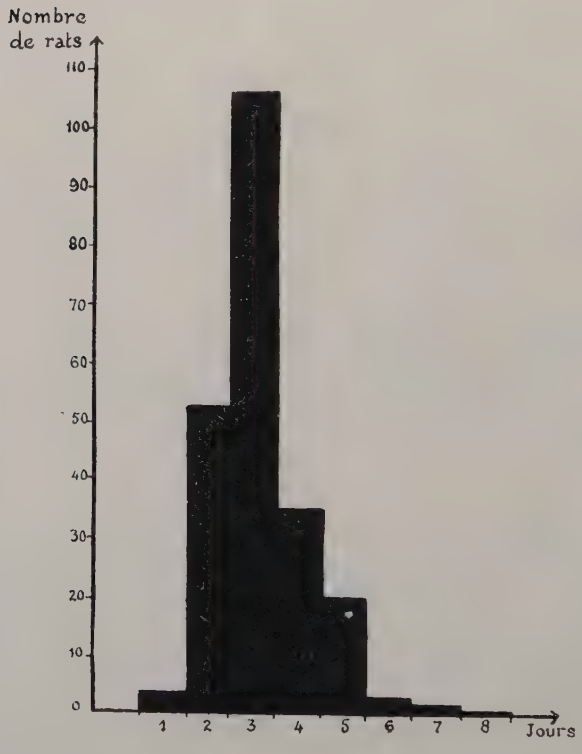

FIG. 2.

Graphique représentant la durée de la période prépatente chez le Rat.
(Expérience portant sur 225 animaux.)

Quoi qu'il en soit, sa durée influe peu sur l'allure de la maladie : que l'inoculat soit riche en parasites (dépassant le millier) ou, au contraire, très pauvre (de l'ordre de 100 *Plasmodium),* l'évolution ultérieure est toujours mortelle pour la Souris.

Chez les Rats, l'intensité et la gravité de l'infection sont fonction de l'âge et du poids : les jeunes Rats de poids inférieur à 100 g. sont beaucoup plus sensibles à l'infection et meurent plus fréquemment que les Rats de 120 à 150 g. qui sont eux-mêmes moins résistants que les gros Rats de poids supérieur à 250 g.

CHAPITRE II

ÉVOLUTION DE L'INFECTION CHEZ LE RAT

Précisons tout de suite que cette évolution dépend en grande partie de la résistance de l'animal à l'anémie : parmi les Rats d'un même lot ayant reçu la même quantité d'inoculat, certains mourront d'une infection faible (2 à 3 %), alors que d'autres guériront après avoir présenté un taux de parasitémie très élevé, pouvant atteindre jusqu'à 50 à 60 p. 100.

Il arrive, d'autre part, que des Rats infestés présentent d'emblée une infection latente : l'examen microscopique ne révèle à aucun moment la présence de parasites dans le sang. Ces cas, qui sont rares (nous en avons constaté 6 sur 225 animaux), peuvent être décelés par inoculation du sang à une Souris neuve.

Durant l'accès parasitaire aigu, le Rat infesté passe par diverses phases : stades de début, d'état, de crise et de déclin, au cours desquels il subit des variations parasitémiques à la fois qualitatives et quantitatives.

I. — MODIFICATIONS QUALITATIVES

Période de début

Elle correspond à l'apparition de *Plasmodium* dans le sang (*).

(*) Dans une note intitulée « La phase tissulaire du *Pl. Berghei* » [4], Van den Berghe, L. Vincke et M. Chardome ont décrit, au Congo belge, chez la Souris et le Rat, des formes schizogoniques dans les cellules

Un étalement sur lame, coloré au May-Grünwald-Giemsa, montre :

1° *Surtout des schizontes jeunes,* en général un ou deux, constitués d'un grain chromatique rouge et d'une étroite bande cytoplasmique bleue entourant une vacuole relativement grande. Les hématies parasitées sont acidophiles et de taille relativement normale.

2° *Les schizontes adultes* se rencontrent moins fréquemment. Ils sont volumineux, polymorphes, et leur cytoplasme s'imprègne de grains très fins d'un pigment brunâtre. La vacuole est presque inexistante. Notons l'hypertrophie globulaire (9 à 14 μ au lieu de 6 à 7 μ, taille normale).

3° *Les corps en rosace* sont exceptionnels à ce stade.

Période d'état

Elle s'étend en général du cinquième au huitième jour de la maladie. Le polyparasitisme devient très prononcé et il n'est pas rare de rencontrer 4 et même 7 parasites d'âges différents dans le même globule : dans ce cas, leurs masses cytoplasmiques se rejoignent, formant des masses bleues à grains chromatiques nombreux.

Les rosaces commencent à apparaître, et le nombre de mérozoïtes y est très élevé : 10 à 15 et même jusqu'à 30; ils sont en navette et disposés irrégulièrement autour de l'amas pigmentaire souvent excentrique.

Presque toutes les hématies parasitées sont polychromatophiles, et il apparaît quelques érythroblastes.

---

histiocytaires du foie, de la moelle osseuse et dans les cellules endothéliales des capillaires, avant l'apparition des parasites dans le sang périphérique. Les figures de schizogonie tissulaire se distinguent des formes sanguines par un nombre plus élevé de mérozoïtes (plus de 30) et un cytoplasme plus basophile. Ces formes de multiplication tissulaire n'ont cependant pas encore été signalées pour les différentes souches de *Pl. Berghei* entretenues dans les divers Laboratoires d'Europe.

Par ailleurs, Galliard et Lapierre [36] ont signalé que le *Pl. Berghei* semble se développer initialement dans le derme, mais que ce stade est certainement transitoire, car plus tard on n'y retrouve pas plus de parasites que dans le sang périphérique.

Les gamétocytes, en général rares, sont sphériques ou légèrement elliptiques, à vacuole nettement visible et à protoplasme hétérogène avec des amas de pigment de grosseurs diverses.

Signalons aussi l'augmentation, au fur et à mesure que l'infection progresse, des réticulocytes [21], hématies à substance réticulo-filamenteuse que l'on peut mettre en évidence en mélangeant une grosse goutte de sang et une goutte d'eau physiologique citratée additionnée de bleu de crésyl brillant à 3 p. 100. Après dix minutes de contact, en chambre humide, on fait un frottis comme d'habitude, qu'on peut surcolorer au May-Grünwald-Giemsa.

Cette augmentation des réticulocytes et des hématies polychromatophiles, éléments jeunes, doit être attribuée à l'activité anormale des organes hématopoïétiques qui essaient de réparer les pertes dues à l'anémie.

Enfin, il convient de signaler la présence, vers la fin de cette période, de quelques formes de souffrance ou *crisis forms :* ce sont des *Plasmodium* altérés dont les contours se confondent avec le stroma globulaire. Parfois même, la masse protoplasmique a presque complètement disparu et est remplacée par quelques taches plus foncées.

Les signes cliniques, inapparents au début de la maladie, deviennent de plus en plus manifestes : plissage de la peau, perte de la coloration rosée des yeux, des oreilles et de la queue, accès fébriles, amaigrissement, état de torpeur.

Période de crise

Puis les évènements se précipitent. La parasitémie est intense : en moyenne, 30 à 40 p. 100 d'hématies parasitées, mais ce taux peut atteindre jusqu'à 70 à 80 p. 100.

On remarque de nombreux faits nouveaux :

1° Prédominance des formes de souffrance;

2° Multiplicité des formes extra-globulaires, à cause de la destruction des hématies;

3° Augmentation des réticulocytes;

4° Augmentation des érythroblastes pluriparasités : leur proportion, par rapport aux hématies, atteint 4 à 6 p. 100 et même 21 p. 100 (cas du Rat n° 205);

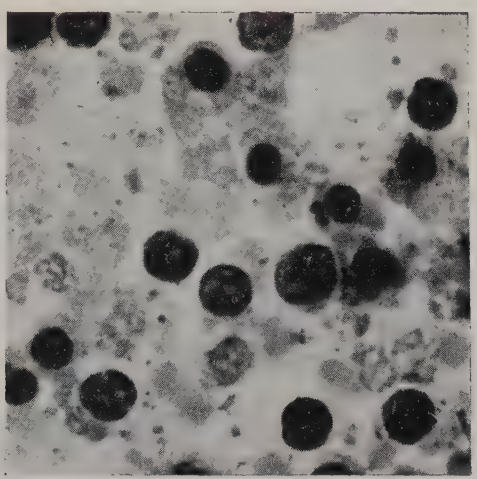

Fig. 3.

Frottis sanguin du Rat n° 205 en pleine période de crise, montrant un très grand nombre d'érythroblastes; remarquer que la plupart d'entre eux sont parasités.

5° Disparition des parasites de certaines hématies polychromatophiles;

6° Enfin, présence, quoiqu'en petit nombre, de parasites dans certains globules blancs.

La période de crise ne dure pas longtemps (en moyenne deux à trois jours).

Deux éventualités peuvent alors se produire :

1° Ou bien l'animal évolue vers la mort. Dans ce cas sa respiration devient de plus en plus pénible, il ne bouge plus, il est secoué par des convulsions sporadiques puis se couche sur le côté et passe insensiblement de l'agonie à la mort;

2° Ou bien il guérit. On peut alors décrire une quatrième période dite de déclin.

Période de déclin

La parasitémie diminue à vue d'œil : en deux jours, ou tout au plus en quatre jours, la proportion d'hématies parasitées diminue à 10 et même 5 p. 100.

L'examen microscopique montre une prédominance de globules rouges polychromatophiles, hypertrophiés, dépourvus de *Plasmodium*. Çà et là, quelques schizontes et formes de souffrance à contour pâle qui ne tardent pas à disparaître à leur tour.

L'animal reprend lentement du poids et son pelage redevient lisse.

Commentaires

1° La description faite ci-dessus correspond à une infestation moyenne (20 à 40 p. 100 d'hématies parasitées).

Dans le cas d'infection bénigne (moins de 10 p. 100), la séparation entre les divers stades n'est pas aussi tranchée, et la période de déclin s'étale sur un temps beaucoup plus long. De plus, la présence d'érythroblastes y est très rare.

2° On ne peut guère prévoir, pour un animal donné, quelle sera la sévérité de l'infection. Celle-ci dépend de beaucoup de facteurs, en particulier de la résistance individuelle à l'anémie, du degré de virulence de la souche, du mode d'inoculation et de la quantité de parasites introduits.

3° Le *Plasmodium Berghei* possède une affinité très grande pour tous les éléments jeunes de la lignée érythrocytaire, non seulement pour les réticulocytes [34, 2, 20], mais aussi pour des éléments beaucoup plus jeunes tels que les érythroblastes.

4° A la différence des *Plasmodium* aviaires ou humains, où il y a nette prédominance d'un stade à un moment

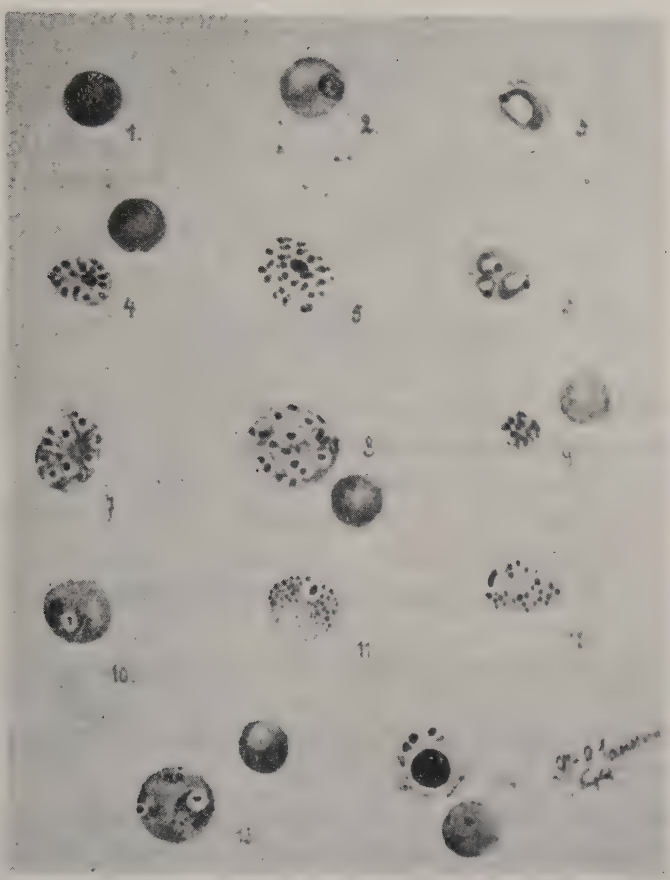

FIG. 4.

Les différentes formes de *Plasmodium Berghei* aux divers stades (d'après VINCKE et LIPS [72]).

Légendes. — *1*, *2*, *3*, trophozoïtes annulaires; *4*, *5*, rosaces de schizogonies; *6*, érythrocyte polyparasité; *7*, *8*, corps bleus incluant des noyaux chromatiques multiples; conglomérat de trophozoïtes remplissant entièrement un globule rouge hypertrophié; *9*, masse bleue extra-globulaire; *10*, *11*, *12*, gamétocytes; *13*, érythrocyte parasité par un macrogamétocyte adulte et deux trophozoïtes annulaires; *14*, deux trophozoïtes annulaires parasitant un érythroblaste.

donné, le *Plasmodium Berghei* présente une intrication des cycles qui aboutit à l'apparition simultanée, à n'importe quel moment, de formes évolutives très différentes.

5° La mort ne survient pas toujours quand la parasitémie est à son maximum, mais elle peut se produire alors que la parasitémie décroît. Ce fait a été déjà signalé par Thomson, Freund, Sommer et Walter, en ce qui concerne le paludisme des oiseaux [65].

II. — MODIFICATIONS QUANTITATIVES

Pour apprécier l'intensité de l'infection, plusieurs procédés peuvent être employés :

1° *Détermination du nombre de « Plasmodium » par champ microscopique.* — Dans cette méthode préconisée par les frères Sergent [61], on compte les parasites qui se trouvent dans dix champs et on fait la moyenne. Si les parasites sont plus rares (moins d'un *Plasmodium* par champ), on pousse l'examen de la préparation jusqu'à trente et même cinquante champs. Enfin, si au bout de cent champs on ne trouve aucun *Plasmodium,* le résultat peut être considéré comme négatif.

Cette technique est cependant très critiquable, car, suivant la façon dont l'étalement est fait (vitesse, inclinaison de la lamelle), la répartition des hématies par champ microscopique est plus ou moins homogène. D'autre part, en queue de frottis, il y a toujours un plus grand nombre de globules rouges polychromatophiles hypertrophiés.

2° *Détermination du nombre absolu des hématozoaires par mm³ de sang* (méthode de Taliaferro et de Freund [33]). — On détermine le nombre de globules rouges par mm³ de sang, le pourcentage de globules rouges parasités, le nombre d'hématozoaires pour cent globules rouges parasités, et on calcule ainsi le nombre absolu d'hématozoaires par mm³.

Cette méthode, très précise, a l'inconvénient d'être

longue. D'autre part, le polyparasitisme des hématies gêne la numération.

3° *Détermination du nombre des hématies parasitées par mm³ de sang* (méthode de Fabiani, Vargues, Grellet [27], que nous avons signalée plus haut à propos de l'inoculation par voie intrapéritonéale, *cf.* p. 18). — C'est une version simplifiée de la précédente.

4° *Détermination du nombre relatif des hématies parasitées par rapport à cent globules rouges.* — Cette méthode, rapide et assez précise, est celle que nous employons dans la pratique courante.

D'ailleurs, l'expérience montre qu'il y a parallélisme entre la courbe représentant le nombre de globules rouges parasités par mm³ de sang et celle indiquant le nombre relatif par rapport à cent globules rouges.

Durée de l'accès parasitaire aigu

Le tableau ci-dessous, portant sur 225 Rats, donne les chiffres suivants :

1er jour	0 cas	10e jour	8 cas.
2e —	0 —	11e —	6 —
3e —	5 —	12e —	4 —
4e —	19 —	13e —	2 —
5e —	23 —	14e —	1
6e —	37 —	15e —	3 —
7e —	58 —	16e —	2 —
8e —	41 —	17e —	1
9e —	15 —		

Durée moyenne : 7 jours.

Aux chiffres précédents correspond le graphique ci-après (fig. 5, p. 32).

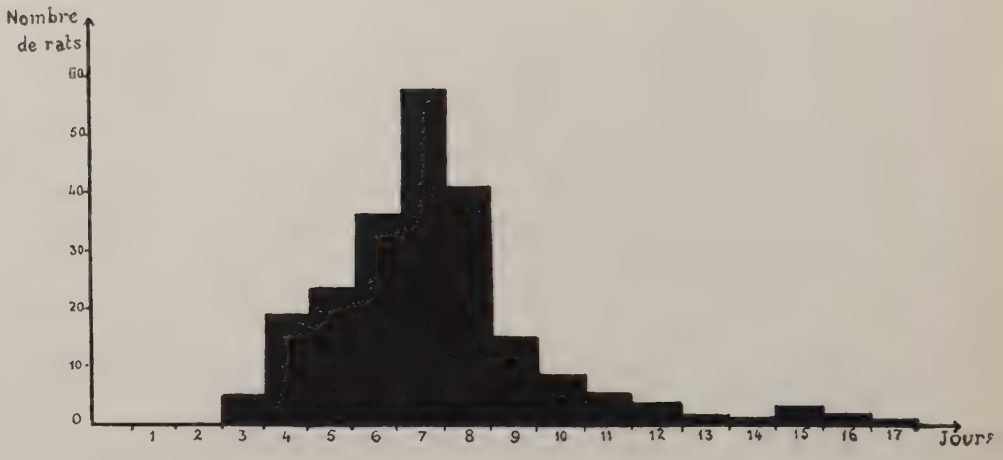

Fig. 5.

Graphique représentant la durée de l'accès parasitaire aigu chez le Rat. (Expérience portant sur 225 animaux.)

Mortalité

Sur les 225 Rats infestés par voie intrapéritonéale, à des doses variables, 137 sont morts, ce qui représente une mortalité de 60 p. 100.

Sur ces 137 Rats :

— 44 sont morts avec une infection sanguine faible (moins de 10 p. 100 de globules rouges parasités) ;

— 75 sont morts avec une infection moyenne (entre 20 et 40 p. 100) ;

— 18 sont morts avec une parasitémie forte (entre 40 et 70 p. 100).

Si on compare ces résultats avec ceux trouvés par les différents auteurs, on note de grandes divergences que nous essaierons d'expliquer plus loin, à propos de la virulence de la souche *(cf.* p. 43).

Vincke et Lips [72] : maladie bénigne;

Corradetti [11] : pas de mortalité;

Galliard et Lapierre [37] : Rats de poids inférieur à 50 g. : 50 % de mortalité;

— Rats de poids d'environ 120 g. : 25 % de mortalité;
— Rats de poids supérieur à 250 g. : jamais de mortalité;
Grellet [39] : 43 %.

Hématologie

Les prélèvements de sang nécessaires aux différents examens hématologiques doivent être effectués à des endroits variés à cause des réactions inflammatoires qui accompagnent la cicatrisation de la zone perturbée et qui provoquent une polynucléose sans rapport avec l'évolution de l'infection.

Nous avons pris le sang alternativement aux pattes, à la queue et aux oreilles. On doit laisser le sang s'écouler spontanément, car le frottement ou la pression modifient la formule.

La ponction intracardiaque ainsi que le prélèvement à l'œil sont à déconseiller à cause de l'anémie qu'ils engendrent, surtout que les examens doivent être répétés à des intervalles assez rapprochés (tous les deux jours).

Les résultats des analyses suivies sur une dizaine de Rats nous permettent de constater que, parallèlement à l'augmentation des parasites, il se produit :

1° *Une anémie très intense* avec anisocytose très marquée : le nombre de globules rouges passe de 8 M., chiffre normal, à 3 M. et même 1.500.000 dans les cas graves. En même temps, on note une diminution du taux d'hémoglobine et de la résistance globulaire.

2° *Une augmentation des leucocytes et principalement des mononucléaires* (lymphocytes et monocytes). Ces derniers semblent d'ailleurs subir des variations soudaines lorsque la parasitémie est élevée.

Quant aux éosinophiles, leur pourcentage ne varie pratiquement pas.

Exemples :

TABLEAU I

PARASITÉMIE ÉLEVÉE

(Rat n° 147. — Inoculation I. P.)

Jours après infest.	2	4	6	8	10
Parasitémie	+	3 p. 100	6 p. 100	20 p. 100	32 p. 100
Neutrophiles	38 p. 100	21 p. 100	24 p. 100	18 p. 100	19 p. 100
Lymphocytes	36 —	50 —	54 —	35 —	34 —
Monocytes	22 —	28 —	22 —	47 —	45 —
Eosinophiles	4 —	1 —	0 —	0 —	2 —
Basophiles	0 —	0 —	0 —	0 —	0 —
Erythroblates	0 —	0 —	+	3 —	3 —

TABLEAU II

PARASITÉMIE FAIBLE

(Rat n° 151. — Inoculation I. P.)

Jours après infest.	2	4	6	8	10
Parasitémie	1 p. 100	2 p. 100	2 p. 100	4 p. 100	5 p. 100
Neutrophiles	45 p. 100	29 p. 100	32 p. 100	30 p. 100	37 p. 100
Lymphocytes	25 —	34 —	22 —	32 —	18 —
Monocytes	28 —	37 —	46 —	34 —	43 —
Eosinophiles	2 —	0 —	0 —	4 —	2 —
Basophiles	0 —	0 —	0 —	0 —	0 —
Erythroblastes	0 —	0 —	0 —	0 —	0 —

3° *Une augmentation des réticulocytes* pouvant atteindre 50 à 60 p. 100 du chiffre des hématies (taux normal : 1 à 2 p. 100).

Autopsie

L'étude du sang périphérique ne nous renseigne que très imparfaitement sur les phénomènes qui se passent dans les organes profonds.

« Le principal acte du drame malarique se passe dans la rate, le foie, la moelle osseuse, etc... et non dans la circulation générale. Ce que l'on constate dans le sang périphérique n'est qu'une scène pour ainsi dire du grand drame qui se produit dans les viscères. » (Manson [48.])

L'autopsie d'un animal mort d'infection aiguë révèle :

1° *Une rate énorme,* pouvant atteindre 6,5 cm. de long (moyenne : 4 cm.). Elle est rouge foncé, presque noire et très fragile : une piqûre d'aiguille, un simple coup de bistouri peuvent provoquer l'issue d'une grande quantité de « boue splénique ».

Le frottis de la rate montre un grand nombre d'érythroblastes, la plupart parasités, de *Plasmodium,* et une grande quantité de pigment.

2° *Un foie très gros,* de couleur chocolat, due comme précédemment à l'accumulation de pigment.

Le frottis montre des *Plasmodium* à des stades très divers, surtout au niveau des capillaires, ainsi que de nombreux macrophages englobant des *Plasmodium* dans leur cytoplasme.

3° *Les poumons,* d'ordinaire de couleur rosée, sont devenus blanc-grisâtre.

4° *L'estomac, l'intestin, le péritoine* sont également plus ou moins imprégnés de pigment mélanique.

CHAPITRE III

ÉVOLUTION DE L'INFECTION CHEZ LA SOURIS

Les tableaux parasitologique, hématologique et clinique sont les mêmes que chez le Rat, mais l'infection est *toujours mortelle* pour la Souris. De plus, les parasites sont moins volumineux, mais les formes extra-globulaires, les formes de division sont plus fréquentes.

L'analyse des observations pratiquées sur 110 Souris donne les résultats suivants au point de vue de la durée de l'accès parasitaire aigu :

1er jour	0 cas	8e jour	2 cas
2e —	2 —	9e —	3 —
3e —	8 —	10e —	1 —
4e —	42 —	11e —	1 —
5e —	37 —	12e —	0 —
6e —	8 —	13e —	1 —
7e —	5 —	14e —	»

Durée moyenne : 4 à 5 jours.

Aux chiffres précédents correspond le graphique ci-après (fig. 6, p. 37).

La parasitémie augmente comme chez le Rat, suivant une progression géométrique. Elle est en général plus élevée et peut atteindre jusqu'à 90 p. 100.

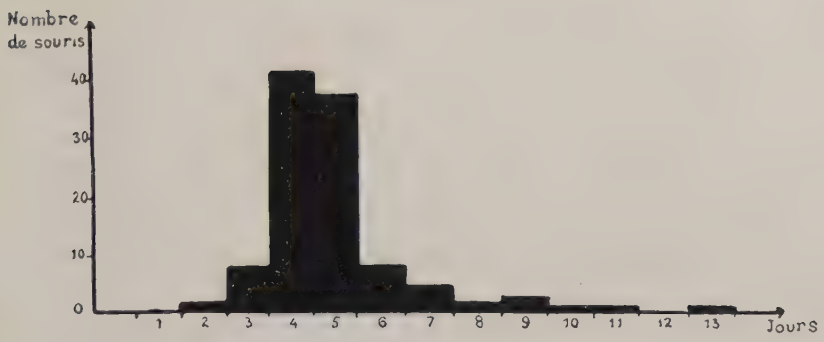

Fig. 6.

Graphique représentant la durée de l'accès parasitaire aigu chez la Souris.
(Expérience portant sur 110 animaux.)

A titre d'exemple, nous donnons ici la courbe de l'évolution moyenne du nombre de parasites chez 12 Souris de même sexe et de poids sensiblement égaux, auxquelles nous avons inoculé par voie intrapéritonéale environ 500.000 parasites.

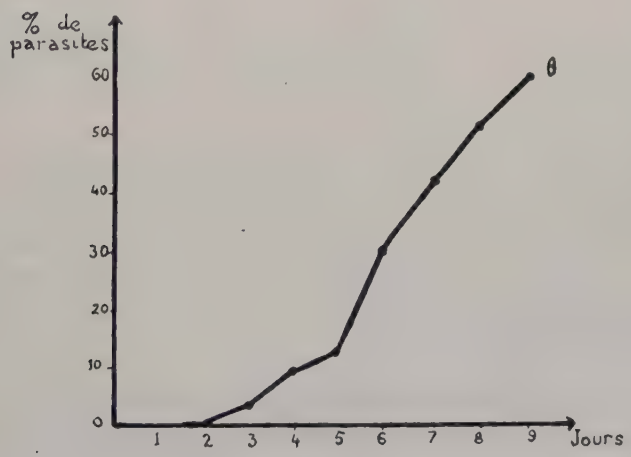

Fig. 7.

Courbe de parasitémie chez la Souris.
(Moyenne portant sur 12 animaux.)

CHAPITRE IV

AUGMENTATION ARTIFICIELLE DE LA PARASITÉMIE

Dans le but d'obtenir une source antigénique plus riche en *Plasmodium* dans des délais plus courts, nous avons essayé de provoquer une augmentation artificielle de la parasitémie.

Nous avons vu *(cf.* p. 28) que le *Pl. Berghei* possède une prédilection marquée pour les formes jeunes des hématies et en particulier pour les réticulocytes.

Par ailleurs, les immunologistes sont d'avis que le système réticulo-endothélial (en abrégé S. R. E.) qui est présent dans tous les organes hématopoïétiques, doit être considéré, avec le tissu lymphoïde, comme le lieu de formation des anticorps.

On conçoit donc qu'il soit possible, en provoquant une augmentation artificielle de la réticulocytose sanguine ou en inhibant le S. R. E. qui intervient comme facteur cellulaire de défense de l'organisme, de faire varier parallèlement l'intensité de l'infection.

AUGMENTATION ARTIFICIELLE DE LA RÉTICULOCYTOSE SANGUINE

Elle peut être réalisée expérimentalement, par injection de vitamine B_{12} ou de phényl-hydrazine [22].

Si quelques jours après avoir injecté de telles substances, on inocule à des Rats du sang parasité, on constate que le

taux de parasitémie augmente très rapidement (jusqu'à 25 p. 100 en quarante-huit heures) et proportionnellement à celui des réticulocytes.

Inversement, par des transfusions quotidiennes de sang de Rats neufs [22], de façon à empêcher l'élévation de la réticulocytose, on peut, malgré l'impaludation, maintenir la parasitémie à un taux très faible ne dépassant pas 2 à 3 p. 100.

ESSAIS D'INHIBITION DU SYSTÈME RÉTICULO-ENDOTHÉLIAL

Findlay et Howard ont montré récemment [32] que la cortisone augmente l'intensité de l'infection par le *Pl. Berghei* chez la Souris.

Les animaux traités meurent en moyenne cinq jours après l'inoculation, alors que ce délai est de neuf jours et demi chez les animaux témoins. Le volume plus petit de la rate chez les animaux traités incline à penser que la réponse cellulaire est inhibée par la cortisone.

Nous avons essayé, d'autre part, d'inhiber le S. R. E. par injection d'antihistaminiques de synthèse. Une inhibition absolue du S. R. E. s'avère, il est vrai, difficile étant donné la prolifération réactionnelle des cellules de ce système qui se produit immédiatement, venant ainsi troubler l'interprétation du phénomène.

L'antihistaminique employé est le *Phénergan* (*) ou N (diméthylamino 2' méthyl 2' éthyl) dibenzo-parathiazine.

Des Rats de même sexe et de poids d'environ 200 g. sont répartis en deux lots de huit. On injecte au premier lot, par voie I. M., 40 mg./kg. de *Phénergan* puis, trente minutes après, on leur inocule, par voie I. P., une dose importante de *Plasmodium* (dans notre expérience, 6.200.000 parasites).

(*) Nous remercions les Laboratoires Spécia qui ont mis gracieusement à notre disposition les échantillons de Phénergan nécessaires à nos expériences.

Les animaux témoins reçoivent, par la même voie, la même dose de parasites.

Le traitement au Phénergan est poursuivi pendant huit jours, à raison de deux injections par jour.

L'évolution de l'infection dans chaque groupe d'animaux est suivie par des examens réguliers de lames de sang (en pratique tous les deux jours).

Les chiffres de parasitémie moyenne sont consignés dans le tableau suivant :

	Animaux traités (8)	Témoins (8)
1er jour	0 p. 100	0 p. 100
2e —	+ —	0 —
3e —	1 —	+ —
4e —	2 —	< 1 —
6e —	6 —	3,5 —
8e —	9 —	4 —
10e —	11 —	5 —
12e —	20 —	9 —

A ces résultats correspondent les deux courbes suivantes :

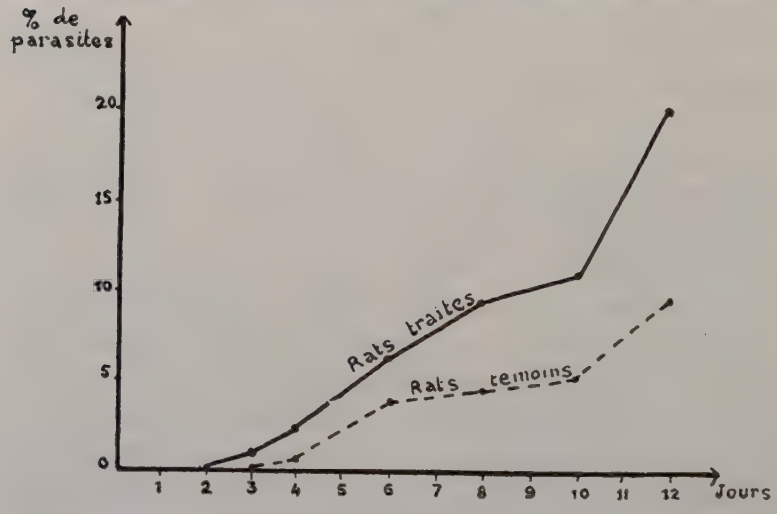

Fig. 8.

Courbes comparatives de l'évolution moyenne de la parasitémie :
— Chez 8 Rats traités au Phénergan (40 mg./kg.);
— Chez 8 Rats témoins.

De cette étude expérimentale, on peut conclure que :

1° Le Phénergan provoque une élévation très nette de la parasitémie, allant du simple au double.

2° La période prépatente est plus courte chez les animaux traités, ainsi que les périodes d'état et de crise.

Des résultats comparables ont été obtenus lors d'autres expériences que nous ne rapportons pas ici.

L'augmentation de la parasitémie constatée avec le Phénergan n'est pas liée à une formule chimique donnée : elle est commune à tous les antihistaminiques de synthèse. C'est ainsi que l'*Antistine Ciba* (*) ou 2-phényl-benzyl-amino-méthyl-imidazoline (méthane-sulfonate), employée à la dose de 80 mg./kg. (qui correspond au point de vue efficacité en tant qu'antihistaminique, à 40 mg./kg. de Phénergan), provoque, dans les mêmes conditions, une parasitémie élevée quoique les résultats soient moins nets.

Les chiffres de parasitémie moyenne sont les suivants :

	Animaux traités (8)	Témoins (8)
1er jour	0 p. 100	0 p. 100
2e —	+ —	0 —
3e —	1 —	+ —
4e —	1,5 —	< 1 —
6e —	3,3 —	1,6 —
8e —	4,5 —	2 —
10e —	9,5 —	6,5 —
12e —	17,5 —	14 —
14e —	22 —	16,5 —

A ces résultats correspondent les deux courbes ci-après (fig. 9, p. 42).

(*) Nous tenons à remercier les Laboratoires Ciba qui nous ont fourni *gratuitement* l'Antistine.

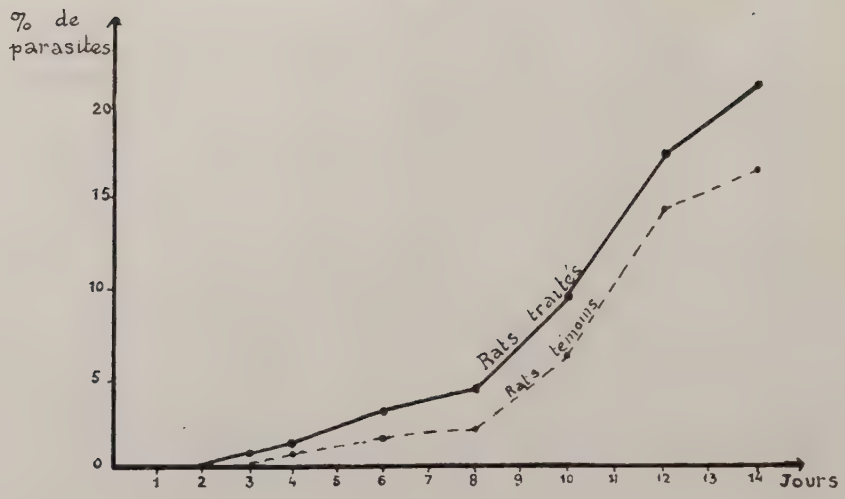

FIG. 9.

Courbes comparatives de l'évolution moyenne de la parasitémie :
— Chez 8 Rats traités à l'Antistine (80 mg./kg.) ;
— Chez 8 Rats témoins.

CHAPITRE V

VARIATIONS DE LA VIRULENCE DE LA SOUCHE

Alors que les divers auteurs : Vincke et Lips [72], Galliard et Lapierre [35], Schneider [59], Mercado et Coatney [50], Grellet [39] et nous-même ont enregistré 100 % de mortalité chez la Souris, les résultats sont très variables en ce qui concerne le Rat, comme nous l'avons vu plus haut *(cf.* p. 32).

Grellet, qui a étudié le *Pl. Berghei* sur des Rats [39], a signalé « alors qu'à la fin de l'automne 1950 (époque à laquelle il a commencé ses expériences), en hiver et au début du printemps 1951, l'infection était habituellement sévère en entraînant la mort approximativement dans la moitié des cas (57 décès sur 103 animaux, soit 55 % ± 8), à partir de la fin du mois de mai 1951 et pendant les mois de juin et de juillet, la virulence a baissé : il n'a plus noté que 3 décès sur 27 animaux (soit 11 % ± 7) » et il a conclu : « Cette baisse de la virulence par passages répétés sur une espèce animale sensible, au lieu de l'habituelle exaltation, est un phénomène fort rare en pathologie infectieuse, mais il a déjà été signalé (par exemple par Cotoni pour le pneumocoque). Il faut signaler qu'il n'y a pas eu en même temps baisse de la virulence pour la Souris. Il est intéressant de noter ce fait qui peut expliquer les différences de résultats obtenus par divers expérimentateurs ».

Black [6] a constaté, par ailleurs, que chez le Rat, après vingt passages, le caractère de l'infection change avec perte de la virulence et diminution du nombre de parasites. Au contraire, il est maintenu chez la Souris.

Ceci peut s'expliquer par l'intervention de facteurs humoraux, d'anticorps qui s'opposent à la multiplication des parasites et en favorisent la phagocytose. Ces anticorps ont eu le temps de se former chez le Rat dont l'infection est toujours beaucoup plus longue que chez la Souris et pas toujours mortelle.

Personnellement, nous avons observé, au bout de trois mois environ, par des passages répétés sur des Rats, une diminution très nette de la virulence : le taux de parasitémie devenait très faible; les schizontes et mérozoïtes étaient beaucoup moins visibles dans les hématies qui restaient cependant polychromatophiles et hypertrophiées. La mortalité a été alors la plus basse enregistrée : 5 décès sur 46 animaux, soit moins de 10 %.

Ces résultats corroborent les observations de Black et de Grellet, et nous avons remarqué en plus que :

1° Lorsque les parasites inoculés provenaient d'un Rat, au début de la parasitémie maxima, la période prépatente était plus courte, l'infestation beaucoup plus meurtrière que si le même nombre de *Plasmodium* était prélevé chez un animal en fin d'infection;

2° Si la virulence s'atténuait par des repiquages successifs sur des Rats, elle pouvait être récupérée intégralement par un nouveau passage sur la Souris. Dans l'exemple cité, alors que nous étions à notre onzième passage de Rat à Rat, nous avons injecté le sang de nouveau à une Souris. L'examen microscopique ne révélait rien jusqu'au sixième jour. A partir de ce moment, des globules rouges polychromatophiles commençaient à apparaître, leur nombre augmentait de plus en plus, mais ils étaient dépourvus de schizontes et de mérozoïtes, lesquels ne se montraient que vers le douzième jour. Puis l'infection prit l'allure d'une

véritable crise, et l'animal ne tarda pas à mourir vers le seizième jour. Le sang de cette Souris, prélevé au moment de son agonie, et injecté par voie I. P. à une Souris neuve et à un Rat neuf, provoqua leur mort respectivement en quatre et sept jours. La souche était donc devenue à nouveau très virulente.

L'expérience a été reproduite ultérieurement avec des résultats similaires. Depuis, pour l'entretien de la souche, nous avons fait des passages alternativement sur des Rats et des Souris.

CHAPITRE VI

IMMUNITÉ

CARACTÈRES DE CETTE IMMUNITÉ

A la période aiguë succède, dans les formes spontanément curables de l'infection du Rat blanc par le *Pl. Berghei*, la période « méta-critique » caractérisée par ce fait que « la maladie, au sens clinique du mot, cesse, mais l'infection continue » (SERGENT).

Dans cet état d'immunité-relative (BORDET), d'immunité-tolérance (MESNIL) ou de prémunition (SERGENT), l'animal est en état de résistance complète ou partielle contre une surinfection, mais un certain temps après que l'infection latente cesse, il redevient vulnérable à une infestation identique.

RECHUTES PARASITAIRES

Il se peut qu'au cours de cette période d'infection latente, le parasite, sous certaines influences, réapparaisse dans le sang circulant. On assiste alors à une rechute, pas toujours accompagnée de signes cliniques, qui peut être mortelle et que l'on découvre fortuitement à l'occasion d'un examen microscopique du sang.

Les rechutes spontanées durent de un à cinq jours et se

produisent généralement six à vingt-deux jours après le rétablissement [7]. Dans la majorité des cas, le nombre de *Plasmodium* par champ varie de 1 à 3.

Les rechutes mortelles apparaissent souvent très tard. Personnellement, nous en avons observé 5 cas.

VIRULENCE DU SANG APRÈS LA GUÉRISON CLINIQUE SPONTANÉE

La stérilité microscopique qui définit l'état d'infection latente n'est qu'apparente. En effet, le sang du Rat prémuni reste virulent pendant très longtemps, jusqu'au cinquantième jour (et même jusqu'au soixante-dixième jour selon Black) [7], et si à ce moment on effectue des inoculations à des Souris, à partir du sang, du foie ou de la rate, les résultats sont positifs.

RÉINOCULATIONS

Les Rats guéris sont réfractaires à une nouvelle infestation.

Expérience. — 6 Rats atteints de primo-infection à des degrés divers, et 6 Rats témoins, de même sexe et de poids sensiblement égaux, ont reçu chacun, par voie I. P., une dose massive de sang parasité. Dans le lot des témoins, seuls 2 Rats ont survécu. Dans l'autre lot, la réinoculation a abouti :

1° Chez 2 d'entre eux, à un résultat négatif : aucun *Plasmodium,* à aucun moment, dans le sang;

2° Chez 3 autres, à une apparition discrète et éphémère de quelques *Plasmodium,* entre le cinquième et le dixième jour;

3° Seul le sixième est mort, sans que l'intensité de l'infection sanguine soit cependant plus forte que lors de la primo-infection.

Dans le cas de Rats hyper-immunisés (ayant subi plusieurs réinfections), aucune apparition de parasites n'a lieu.

Ces observations sont confirmées par les épreuves d'inoculation massive (jusqu'à 500 M. de parasites) intracardiaque [68] et intrapéritonéale [29] de Fabiani et Vargues, destinées à étudier le devenir des parasites de réinoculation [50].

De leurs expériences, il ressort que les *Plasmodium* réinoculés ne persistent pas longtemps dans le sang circulant (au maximum vingt-quatre heures), mais en même temps, une nouvelle génération plasmodiale apparaît, représentée par des schizontes jeunes parasitant des hématies acidophiles, de taille normale. Ils sont cependant peu nombreux (3 à 4 p. 1.000 hématies normales) et disparaissent à leur tour au bout de trois à quatre jours.

ESSAIS D'IMMUNISATION PASSIVE *IN VITRO*

Dans le but de déterminer le degré de protection du sérum immunisé, nous avons mélangé du sang de Rat fortement parasité et recueilli sur citrate, à un volume égal d'immun-sérum ou de sérum normal (dans les deux cas, les sérums sont inactivés et conservés à — 25° depuis deux mois).

Après incubation pendant trois quarts d'heure à 37°, avec de fréquentes agitations, nous avons injecté par voie I. P. :

— A un premier lot de 5 Rats : 0,5 cm³ du mélange sang parasité - immun-sérum;

— A un deuxième lot de 5 Rats (témoins) : 0,5 cm³ du mélange sang parasité - sérum normal.

L'examen des frottis sanguins, pratiqué tous les deux jours, donne les résultats consignés dans le tableau III, p. 49.

Il semble donc que l'immun-sérum, du moins dans les conditions opératoires ci-dessus indiquées, ne possède pas de pouvoir protecteur.

TABLEAU III

Jour après infestation	Rats recevant le mélange sang parasité plus immun-sérum (moyenne)	Rats recevant le mélange sang parasité plus sérum normal (moyenne)
3e jour	1 p. 100 G. R. P.	1 p. 100 de G. R. P.
5e —	3 — —	2,5 — —
7e —	9 — —	8 — —
9e —	17 — —	19 — —
11e —	22 — —	25 — —

Remarquons que nous n'avons observé, après trois quarts d'heure de contact du mélange sang parasité - immun-sérum, aucun phénomène d'agglutination au microscope.

INFLUENCE DE LA RATE

Elle a été bien étudiée par Galliard et Lapierre [37], et par Fabiani et Vargues [28].

Chez les Rats splénectomisés puis infectés, l'anémie est intense et la mortalité atteint en général 100 %. La préparation montre un polyparasitisme très prononcé des hématies nucléées, une abondance de formes extra-globulaires et des formes de division multiples. Il convient aussi de noter des variations brutales de la formule leucocytaire, avec décharges soudaines de polynucléaires.

Dans le cas de Rats précédemment infectés et ayant guéri de leur infection, la rechute parasitémique se produit dans plus de la moitié des cas. Elle présente certaines particularités que l'on n'observe pas dans la primo-infection : persistance pendant quelques jours de rares hématozoaires dans le sang, puis augmentation soudaine et massive de parasites qui conduit fatalement à la mort; de plus, réveil d'une bartonellose latente.

De même, l'ablation des surrénales peut provoquer le réveil de l'infection plasmodiale, mais cet effet, variable quand la rate est présente, est constant quand celle-ci a été précédemment enlevée.

Ces observations montrent ainsi le rôle primordial de la rate et des surrénales dans les processus immunitaires.

CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE

L'infestation expérimentale des Rats blancs par le *Pl. Berghei* ressemble à celle des Souris blanches, mais elle n'est pas toujours mortelle.

Dans les formes spontanément curables, la guérison présente l'allure d'une véritable crise avec disparition soudaine et massive des parasites, et donne lieu à un état d'immunité-relative appelé par certains prémunition.

Les sujets ainsi prémunis sont résistants à des surinfections par les mêmes parasites.

Bien que nos expériences ne nous aient pas permis de mettre en évidence *in vitro* des facteurs humoraux protecteurs, nous allons, en utilisant d'autres propriétés immunologiques, démontrer la présence des anticorps dans les sérums de Rats porteurs de *Plasmodium*.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE ANTIGÉNIQUE DU « PLASMODIUM BERGHEI »

ÉTUDE ANTIGÉNIQUE DU « PLASMODIUM BERGHEI »

Le problème de la spécificité antigénique des *Plasmodium* a déjà attiré l'attention de nombreux auteurs tels que Coggeshall et Eaton [47], Dulaney, Warren et Stratman-Thomas [17], Lippincott et Gordon [45], pour ne citer que les principaux.

En partant de sang de Singes ou de Poulets fortement infestés respectivement par le *Pl. Knowlesi* et le *Pl. gallinaceum,* ils ont pu obtenir, notamment par lyse par l'eau distillée, congélations et décongélations successives, des antigènes « purifiés » qui donnèrent des réactions de fixation du complément positives avec des sérums humains de paludéens.

Les résultats, quoique très encourageants, ne furent pas cependant assez spécifiques.

Nous avons repris la question en travaillant sur le Rat blanc et la Souris blanche, dont l'infection par le *Pl. Berghei* est intense et rapide, et nous avons essayé d'isoler les *Plasmodium* après concentration préalable des hématies parasitées. Celle-ci est possible grâce à la différence de densité qui existe entre les globules rouges normaux et les globules rouges parasités.

Ces derniers sont plus grands, mais plus légers, et ont tendance, lors de la centrifugation du sang parasité recueilli sur anticoagulant, à se masser à la partie supérieure du culot d'hématies, un peu au-dessous des globules blancs.

CHAPITRE PREMIER

DÉTERMINATION DE LA DENSITÉ DES GLOBULES ROUGES PARASITÉS

Elle est effectuée d'après la technique de Philips et Van Slyke [53], dont voici le principe :

En laissant tomber une goutte de sang dans des solutions de SO_4Cu de densité connue, chaque goutte s'entoure d'une pellicule de protéinate de cuivre, ce qui permet d'observer son comportement pendant dix à quinze secondes. Si sa densité est plus élevée que celle de la solution de SO_4Cu utilisée, la goutte tombera au fond du vase; dans le cas contraire, elle flottera à la surface. Si sa densité est égale à celle de la solution, la goutte restera flottante pendant dix à quinze secondes avant de tomber au fond où elle se désagrègera progressivement.

PRÉPARATION DES SOLUTIONS

Les solutions de densité croissante sont préparées à partir d'une solution-mère de densité 1.100.

A. — Préparation de la solution-mère

Dans un flacon de 2 l., on met 170 g. de $SO_4Cu, 5\,H_2O$. On remplit un ballon jaugé de 1 litre avec de l'eau distillée et on ajoute à la pipette la quantité d'eau suffi-

sante pour obtenir le volume final indiqué dans la deuxième colonne de la table ci-dessous, selon la température de l'eau.

TABLEAU IV

Température de l'eau	Cm³ d'eau pour 170 g. de $SO_4Cu, 5 H_2O$	Cm³ d'eau pour 42,5 g. de $SO_4Cu, 5 H_2O$
38°	1.000,2	250
36°	1.001,2	250,3
34°	1.002,2	250,5
32°	1.003,2	250,8
30°	1.004,3	251,1
28°	1.005,3	251,3
26°	1.006,3	251,6
24°	1.007,4	251,8
22°	1.008,4	252,1
20°	1.009,5	252,4
18°	1.010,5	252,6
16°	1.011,5	252,9
14°	1.012,6	253,1

On verse cette eau sur SO_4Cu, pour le dissoudre par agitation. On rince le ballon jaugé de 1 litre avec la solution obtenue pour enlever les dernières traces d'eau.

Il est utile de vérifier la densité de la solution-mère au densimètre.

B. — Préparation des solutions standard de la gamme

Pour chacune d'elles, on prend une quantité de solution-mère de densité 1.100, égale au nombre indiqué par les deuxième et troisième décimales du chiffre de densité moins 1; on complète à 100 cm³ avec de l'eau distillée.

Exemple. — Pour avoir la solution standard de densité

1.076, on prendra 75 cm^3 de solution-mère de densité 1.100 et on complètera à 100 cm^3 avec de l'eau distillée.

Prélèvement de l'échantillon de sang. — Le seul anticoagulant qui ne modifie pas sensiblement la densité de l'échantillon est l'héparine (0,2 mg. pour 1 cm^3 de sang). Le citrate de soude ne peut pas être utilisé, car il modifie trop la densité.

Technique de la mesure des densités. — Le sang est recueilli sur anticoagulant et prélevé à l'aide d'un compte-gouttes.

On laisse tomber une goutte de sang, de plasma ou de globules rouges dans le flacon contenant la solution de SO_4Cu, à environ 1 cm. de la surface. On observe le comportement de la goutte pendant les dix ou quinze secondes qui suivent la chute.

Résultats. — Nous avons trouvé, par cette méthode, les chiffres suivants :

1° Rats. — Sang normal : 1.055.
Globules rouges normaux : 1.065.
Sang parasité (aux environs de 40 p. 100) : 1.030.
Globules rouges parasités : 1.034.

2° Souris. — Sang normal : 1.048.
Globules rouges normaux : 1.054.
Sang parasité (aux environs de 45 p. 100) : 1.028.
Globules rouges parasités : 1.033.

Il convient de remarquer que la densité du sang parasité et, partant, celle des globules rouges parasités, varie un peu avec l'intensité de l'infection.

Le problème revient donc à isoler les globules rouges parasités à l'aide d'une substance de densité sensiblement égale à la leur.

Dans des essais pour enrichir la préparation et permettre

la détection du *Pl. vivax* à des concentrations inférieures à 100 *Pl.*/cm^3 de sang (alors qu'il faut au moins 10.000 *Pl.*/cm^3 pour qu'on puisse les déceler par la méthode de la goutte épaisse), Ferrebee et Geiman [31], puis Berliner et Bigelow [5] ont utilisé comme substance intermédiaire la solution albumineuse d'œuf ou de bœuf.

Nous ne sommes pas partisan de l'emploi d'une telle substance qui risque d'apporter des protéines étrangères à notre antigène. Nous avons choisi le Subtosan, ou polyvinyl-pyrrolidone, substance chimiquement pure et de viscosité comparable à celle de la solution d'albumine que nous diluons à la densité voulue avec de l'eau physiologique.

CHAPITRE II

PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE

PRÉLÈVEMENT DE SANG

Comme animal « donneur », nous avons préféré le Rat à la Souris. En effet, la parasitémie, relativement plus faible chez le Rat, est largement compensée par l'apport d'une plus grande quantité de sang, ce qui nous permet de réaliser de substantielles économies.

Le sang est prélevé au moment où les parasites sont les plus gros et les plus nombreux.

L'emploi du citrate de soude comme anticoagulant est à déconseiller, car on connaît l'action inhibitrice de ce sel sur l'alexine; on peut donc supposer que cette substance agit aussi sur l'antigène.

L'héparine présente également une certaine activité anticomplémentaire, mais étant donné la dose très faible à laquelle nous l'employons (0,15 mg. par cm^3 de sang) et les lavages répétés que nous faisons subir par la suite au culot d'hématies parasitées, on peut négliger cette activité.

La saignée peut être effectuée de diverses manières :

— *Ponction cardiaque*, d'après le mode opératoire déjà décrit *(cf.* p. 19) ;

— *Prélèvement à l'œil*, par ponction du plexus ophtal-

mique, selon la technique suivante indiquée par Halpern et Pacaud [39 bis] :

« L'animal étant saisi sur le dos, la tête solidement maintenue dans cette position à l'aide de la main gauche, on aborde l'œil par l'angle antéro-interne. On exerce une traction sur la peau, de manière à faire saillir le globe oculaire.

« A l'aide de la main droite, on enfonce l'extrémité effilée de la pipette contenant une goutte d'héparine, délicatement mais fermement, derrière le globe oculaire, jusqu'à ce qu'on rencontre l'os dans la région sphénoïde. On sent une petite dépression qui correspond au point de confluence des veines ophtalmiques. On retire alors très légèrement la pipette et on y voit généralement apparaître le sang qui monte par capillarité. Si, toutefois, la pipette est trop grosse, il peut se produire un saignement qui, le plus souvent, s'arrête spontanément. Le danger consiste à enfoncer la pipette dans le trou déchiré antérieur. On peut alors déterminer une lésion artérielle ou même une fracture osseuse, et l'animal succombe par hémorragie nasale. »

Dans tous les cas, on répartit le sang aussitôt dans des tubes stériles contenant la quantité nécessaire d'héparine.

ÉLIMINATION DU PLASMA ET DES GLOBULES BLANCS. — SÉPARATION DES HÉMATIES PARASITÉES.

Dès son prélèvement, le sang est centrifugé à 2.000 tours-minute pendant vingt minutes, en présence d'un demi-volume de Subtosan dilué à la densité voulue.

On obtient plusieurs couches :

1° Une couche inférieure rouge, constituée par les hématies normales;

2° Une couche moyenne, légèrement rouge-brunâtre, représentant les hématies parasitées en suspension dans le Subtosan;

3° Une couche blanchâtre, correspondant aux globules blancs;

4° Une couche supérieure liquide qui est le plasma.

A l'aide d'une pipette stérile, on aspire le plasma et les globules blancs qu'on rejette.

On recueille ensuite la portion contenant les hématies parasitées. Comme la séparation entre les deux couches d'hématies normales et d'hématies parasitées n'est pas bien nette, il convient, par mesure de précaution, de prélever jusqu'à un niveau légèrement supérieur à la limite présumée.

On lave cette portion plusieurs fois avec de l'eau physiologique contenant 100 mg. p. 100 de glucose et tamponné à *p*H 7. Il convient, en effet, pour éviter l'altération des parasites, de leur fournir certains facteurs pendant toute la durée de la préparation.

Pour la même raison, il est recommandé d'opérer à basse température.

Elimination de l'hémoglobine

De tous les agents d'hémolyse chimique, la saponine semble convenir le mieux.

Nous l'avons essayée en solution à 20 mg. p. 100 dans l'eau physiologique tamponnée à *p*H 7. Pour chaque cm^3 de culot d'hématies, nous avons employé 20 cm^3 de solution de saponine, mais au bout de trente minutes de contact, l'hémolyse reste insignifiante; elle ne se manifeste que par une teinte rougeâtre du liquide, surnageant une masse abondante de globules rouges non lysés.

Evidemment, en augmentant la concentration en saponine, nous aurions pu obtenir une hémolyse plus poussée, mais, ce faisant, nous risquons d'apporter trop d'impuretés à notre antigène.

Aussi, avons-nous utilisé pour la lyse des hématies, simplement de l'eau distillée froide.

Le culot d'hématies parasitées, préalablement lavé, est additionné de trois à quatre fois son volume d'eau distillée froide et glucosée à *p*H 7, et laissé à la glacière pendant une heure, avec de fréquentes agitations. Ce délai passé, on effectue plusieurs lavages avec de l'eau distillée froide, jusqu'à ce que le liquide surnageant le dépôt soit complètement incolore.

Elimination du stroma

Ce dépôt est contitué par le stroma qui englobe dans ses mailles les parasites qu'il s'agit d'isoler. Nous avons essayé successivement plusieurs méthodes :

1° *Centrifugation différentielle.* — Le stroma est moins dense que les parasites, et nous avons cru pouvoir le séparer ainsi en centrifugeant à très faible vitesse et pendant longtemps (1.000 tours-minute pendant une heure, par exemple), mais la séparation est loin d'être parfaite et nous avons dû y renoncer.

2° *Centrifugation en présence d'éther, après hémolyse par l'eau distillée.* — Le stroma se rassemble à l'interface eau-éther, entraînant cependant avec lui une bonne partie des parasites. Cette méthode est donc à rejeter, d'autant plus que l'éther dissout sélectivement les lipides, ce qui serait gênant si l'antigène spécifique est, comme l'ont voulu Dulaney et Morrison [16], de nature lipido-protidique pour le *Pl. Knowlesi.*

3° *Précipitation au pH iso-électrique.* — Le stroma précipite à pH_i 5,5, mais comme les flocons englobent dans leur réseau les parasites que nous n'avons pas pu dissocier par une centrifugation ultérieure, nous n'avons pas retenu cette méthode.

4° *Digestion enzymatique.* — C'est la méthode que nous avons définitivement adoptée.

Comme le stroma est en majeure partie constitué par des protéines (80 p. 100) dont la stromatine, nous avons pensé que le meilleur moyen pour le séparer consisterait à faire agir des enzymes protéolytiques, à savoir : papaïne, pepsine, trypsine, mais cette digestion doit être *sélective*, sinon les parasites risqueraient d'être complètement digérés aussi [54].

La trypsine, employée à la dose de 0,125 g. p. 100 à *p*H 5-5,5 (alors que son *p*H optimum d'activité est de 8) et à la température de 27° C. (température optima : + 40° C.), nous a donné les résultats les plus satisfaisants.

Elle présente l'avantage d'agir lentement, ce qui permet un contrôle par observation microscopique.

La solution de trypsine s'altérant facilement, il convient de la préparer extemporanément.

Mode opératoire. — Pour chaque cm³ de stroma, nous employons 10 cm³ de solution trypsique à *p*H 5-5,5, et le mélange est laissé à l'étuve à + 27° C. avec de fréquentes agitations.

Les progrès de la digestion différentielle peuvent être contrôlés par observation au microscope à des intervalles réguliers.

En général, après deux heures et demi de contact, la digestion est déjà très avancée, et un étalement sur lame coloré au May-Grünwald-Giemsa montre les schizontes sous forme de gros bâtonnets violet-foncé avec un peu de stroma. Ce dernier est complètement digéré après vingt heures.

On centrifuge alors, et le culot est lavé plusieurs fois avec de l'eau physiologique glucosée.

Le dépôt de *Plasmodium* est additionné d'eau distillée (5 cm³ p. 0,10 g. environ).

Par congélations et décongélations successives, et cela une dizaine de fois, accompagnées de broyage au mortier entre chaque opération, on obtient un liquide brun clair

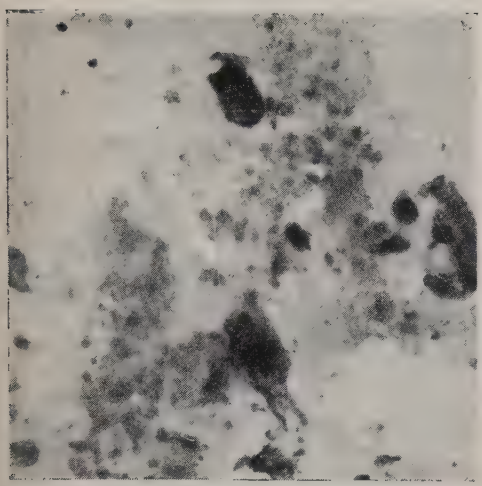

FIG. 10.

I. — Avant la digestion trypsique.
(Beaucoup de stroma, peu de *Plasmodium.)*

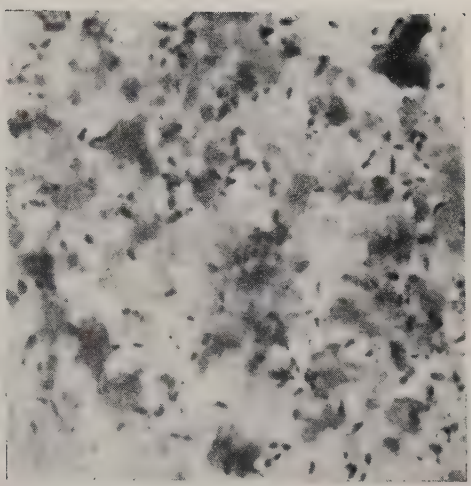

FIG. 11.

II. — Après deux heures et demie de digestion trypsique.

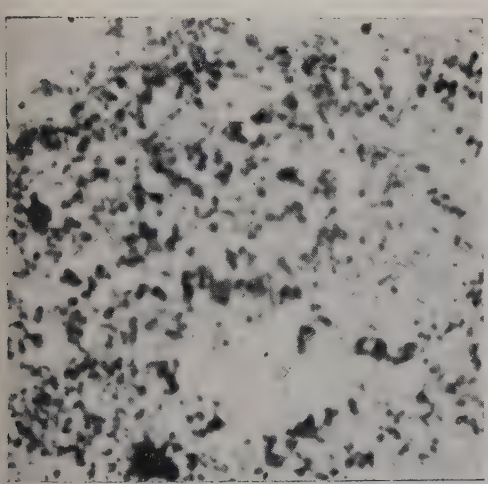

FIG. 12.

III. — Après quinze heures de digestion trypsique.

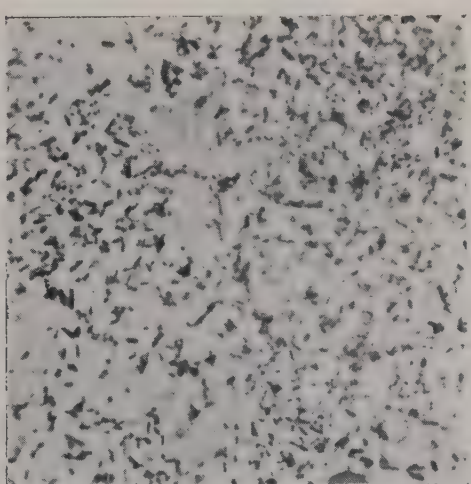

FIG. 13.

IV. — Après vingt heures de digestion trypsique.

surnageant un dépôt noirâtre représentant les débris de *Plasmodium*. Ce liquide constitue notre solution-mère d'antigène.

Nous avons constaté que, diluée au 1/5e ou au 1/10e, elle ne possède pratiquement pas de pouvoir anti-complémentaire. C'est à ces taux que nous les employons.

Les différents lots d'antigène que nous avons préparés par la suite se sont révélés de valeur à peu près identique.

Récolte et conservation des sérums

Les sérums nécessaires à la réaction proviennent :

1° *De Rats spontanément guéris;* leur sang est prélevé à des intervalles allant de huit jours jusqu'à trois mois, à partir du moment de l'infection;

2° *De Rats hyper-immunisés* par des infestations répétées.

Dans les deux cas, le sang est recueilli sans anticoagulant. Il convient d'opérer rapidement, car le sang de Rat étant très riche en prothrombine, se coagule instantanément (beaucoup plus vite que celui de Souris).

Après une demi-heure environ de repos à la température du Laboratoire, on décante le sérum et on le centrifuge pour obtenir un liquide limpide débarrassé de globules rouges. Puis il est inactivé par chauffage pendant une demi-heure à 56° et conservé à la glacière à — 25°.

CHAPITRE III

RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT

La technique employée pour la détection des anticorps est inspirée de celle de Kolmer. Cette dernière, réalisée sur sérum décomplémenté, et malgré l'utilisation d'un large excès de complément (2 unités), conserve cependant une sensibilité très grande grâce à une fixation prolongée à basse température : + 6° à + 8° C. pendant douze à seize heures.

Pour parer, dans la réaction proprement dite, à l'effet anticomplémentaire du sérum de Rat (en général assez marqué), nous avons dû effectuer le titrage du jour du complément, non seulement en présence de l'antigène — comme cela se fait d'habitude —, mais aussi en présence de sérum normal pur ou dilué au même taux que celui employé dans la réaction.

TITRAGE PRÉALABLE DU SÉRUM HÉMOLYTIQUE

Le sérum hémolytique utilisé est celui fourni par l'Institut Pasteur. On en prépare une solution-mère au 1/1.000e, dans l'eau physiologique, à partir de laquelle on prépare des dilutions au 1/2.000e, 1/3.000e..., 1/16.000e.

On dispose ensuite le titrage comme suit (0,05 cm³ = 1 goutte normale donnée par la pipette de Duclaux).

Solution-mère à 1/1.000	1	1/2	1/3	1/4	...1/16
Dilutions de sérum hémolytique	1/1.000	1/2.000	1/3.000	1/4.000	...1/16.000
Sérum hémolytique dilué	0,10	0,10	0,10	0,10	...0,10
Sérum normal de Rat	0,05	0,05	0,05	0,05	...0,05
Complément au 1/30	0,30	0,30	0,30	0,30	...0,30
Eau physiologique.	0,20	0,20	0,20	0,20	...0,20
Globules rouges à 2 p. 100	0,10	0,10	0,10	0,10	...0,10

B.-M. à 37° pendant une heure.

La dose minima de sérum hémolytique donnant une hémolyse totale constitue l'unité hémolytique. Pour le titrage du complément et pour la réaction, on utilise *deux unités hémolytiques.*

TITRAGE DU JOUR DU COMPLÉMENT

	(Ces chiffres sont exprimés en centimètres cubes)					
Complément au 1/30	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35
Sérum normal de Rat	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Eau physiologique	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05
Antigène dilué ..	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
	Une demi-heure au B.-M. à + 37°.					
Sérum hémolytique à 2 unités.	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Globules rouges à 2 p. 100	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
	Une heure au B.-M. à + 37°.					

La plus forte dilution de complément donnant une hémolyse totale contient la *dose minima active* ou *unité vraie*, et pour la réaction *on utilise deux unités vraies* amenées au volume de 0,4 cm³.

RÉACTION PROPREMENT DITE

A. — Qualitative

	Réaction	Témoin sérum	Témoin antigène	Témoin syst. hém.	Témoin globules
Sérum à examiner inactivé	0,05	0,05	»	»	»
Antigène dilué ...	0,10	»	0,10	»	»
Eau physiologique.	»	0,10	0,05	0,15	0,55
Complément dilué à 2 u.	0,40	0,40	0,40	0,40	»
Laisser douze à seize heures à 6-8° C.					
Réchauffer dix minutes à 37° C.					
Sérum hémolytique à 2 u.	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Globules rouges à 2 p. 100	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Mettre au B.-M. à 37° C. pendant une heure.					

En pratique, on lit les résultats après lyse complète des témoins sérum et antigène.

Des témoins avec sérums normaux inactivés sont employés à titre de contrôle.

Notation des résultats (notation en croix).

On considère l'aspect du tube-réaction :

1° Un tube *négatif* (—) montre une hémolyse complète;

2° Un tube *très fortement positif* (+ + + +) montre une absence totale d'hémolyse;

3° Des degrés intermédiaires s'observent :

— *Moyennement positif* (+ +) si une proportion sensible (le tiers ou la moitié) des globules est lysée;

— *Faiblement positif* (+) si une proportion importante (les deux tiers ou les trois quarts) des globules est lysée;

— Enfin *douteux* (±) si presque tous les globules sont lysés et ne laissent qu'un léger louche représentant de 5 à 15 p. 100 de globules intacts.

B. — Quantitative

La technique simplifiée à deux tubes, décrite ici (les tubes témoins antigène, système hémolytique, globules rouges ne sont faits en effet qu'une fois pour tous les sérums), se prête très bien au test quantitatif. Il suffit de faire des dilutions de plus en plus grandes du sérum à examiner en passant d'un tube à l'autre : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32...

On fera sur chaque dilution la réaction à deux tubes, dans les mêmes conditions que pour le test qualitatif. On note la plus grande dilution qui donne encore une hémolyse incomplète correspondant à +, le tube suivant devant être parfaitement clair.

RÉSULTATS
VARIATIONS DU TAUX DES ANTICORPS

Les résultats sont consignés dans les tableaux ci-après :

A. — Réaction qualitative

a) *Rats ayant subi une seule infestation et évoluant vers la guérison :*

Rat n°	Date de prélèvement de sang (à partir du moment de l'infestation)	Réaction
194	8e jour	—
166	12e —	±
112	15e —	++
161	26e —	+++
133	60e —	+
45	110e —	±

b) *Rats guéris et réinfectés trois fois :*

Rat n°	Date de prélèvement de sang (à partir du moment de la deuxième réinfection)	Réaction
109	12e jour	+++
12	16e —	++++

c) *Rats guéris et réinfectés quatre fois :*

Rat n°	Date de prélèvement de sang (à partir du moment de la quatrième réinfection)	Réaction
123	10e jour	++++
115	15e —	++++

Ainsi donc, les anticorps fixant le complément apparaissent en général vers le douzième jour après le début de l'infection.

Ils atteignent leur maximum entre le quinzième et le trentième jour, diminuent ensuite en titre, mais restent encore décelables trois mois après.

Chez les Rats hyper-immunisés, leur taux est très élevé. Aussi, sommes-nous amené à pratiquer, sur les sérums de ces Rats, le test quantitatif.

B. — Réaction quantitative

Taux de dilut.	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Rat n° 109....	+++	+++	++	++	+	—	—	—
Rat n° 12....	++++	++++	+++	++	+	+	—	
Rat n° 123....	++++	++++	+++	+++	++	++	+	—
Rat n° 115....	++++	++++	+++	++	++	+	—	—

C. — Comparaison avec l'antigène de Vargues

Nous avons effectué les réactions précédentes, non seulement avec notre antigène, mais aussi avec celui de Vargues obtenu à partir du foie de Rat fortement infesté [66].

La préparation de cet antigène est la suivante :

Après un début d'autolyse par repos en glacière pendant quatre à cinq jours, le foie est finement broyé en présence de 0,9 g. de chlorure de sodium, l'hypertonie libérant les liquides cellulaires; quatre heures après le broyage et l'addition de sel, on ramène la suspension à l'isotonie par addition d'eau distillée. On la laisse reposer à la glacière pendant quelques jours, puis on centrifuge pendant deux heures à 3.000 tours-minute. C'est le liquide surnageant qui sert d'antigène.

Les résultats comparés des deux antigènes sont fournis par les tableaux ci-après.

A. — Test qualitatif

Rat n°	Antigène personnel	Antigène de Vargues
194	—	—
166	±	+
112	++	++
161	+++	+++
133	+	++
45	±	+
109	+++	+++
12	++++	++++
123	++++	++++
115	++++	+++

B. — Test quantitatif

Rat n°	Antigène personnel		Antigène de Vargues	
109	Réaction positive jusqu'à la dilution.	1/16	Réaction positive jusqu'à la dilution.	1/8
12		1/32		1/32
123		1/64		1/64
115		1/32		1/64

La comparaison des résultats montre que notre antigène constitué de *Plasmodium* est au moins aussi sensible, sinon plus spécifique que celui de Vargues : ce dernier renferme en effet une grande quantité de protéines étrangères provenant du tissu hépatique.

VARIATIONS ALEXIQUES

Cette étude a été entreprise par Fabiani et Vargues [67].

Le pouvoir alexique est déterminé par la plus petite quantité de sérum frais qui provoque l'hémolyse totale du système globules rouges de Rat - sérum hémolytique; dans ce tube existe au moins une unité alexique. On calcule le nombre d'unités par cm^3 de sérum.

Les auteurs ont constaté que le taux alexique, qui est relativement stable chez le Rat normal, varie en sens inverse de l'infestation sanguine au cours de la maladie : presque nul au maximum de la parasitémie, il disparaît complètement au cours de la phase agonique. Au contraire, si la guérison survient, son taux augmente progressivement.

UTILISATION DE NOTRE ANTIGÈNE AU SÉRO-DIAGNOSTIC DU PALUDISME HUMAIN

Étant donné que des réactions croisées se produisent entre les antigènes à base de *Pl. Knowlesi, Pl. gallinaceum* et des sérums humains de paludéens *(cf.* p. 53), nous avons pensé que, par analogie, de telles réactions sont possibles entre l'antigène à *Pl. Berghei* et les mêmes sérums.

Les vrais paludéens sont rares dans la région bordelaise; ils proviennent tous de territoires d'Outre-Mer. Néanmoins, nous avons pu prélever, en l'espace de deux mois, le sang de quatre individus à paludisme plus ou moins confirmé, et de deux paralytiques généraux traités par malaria-thérapie.

Les sérums humains étant très peu anti-complémentaires, nous avons adopté la technique originale de Kolmer, sans addition de sérum normal lors des titrages préalables. De plus, le complément est employé au 1/50e au lieu de 1/30e. Des sérums humains normaux sont testés conjointement.

Les résultats sont cependant négatifs; seul un sérum paludéen donne une réaction douteuse.

Malgré l'absence de réaction nettement positive, le cas douteux incline cependant à penser qu'on pourrait, par une concentration plus poussée en *Plasmodium* ou par adjonction de substances adjuvantes, arriver à augmenter la sensibilité de cet antigène, ce qui permettrait de l'utiliser dans le séro-diagnostic du paludisme humain.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

I. — L'infestation de la Souris blanche par le *Plasmodium Berghei* est sévère et toujours mortelle. Chez le Rat blanc, elle varie au contraire avec l'âge, le poids, le degré de résistance de l'animal à l'anémie.

II. — L'affinité du *Plasmodium Berghei* pour les hématies immatures, en particulier les réticulocytes, permet, en agissant sur ce facteur, d'augmenter artificiellement la parasitémie.

Cette augmentation peut être aussi réalisée en inhibant le système réticulo-endothélial par des anti-histaminiques de synthèse tels que le Phénergan, l'Antistine.

III. — La virulence de la souche baisse par passages répétés de Rat à Rat; on peut cependant l'exalter par un nouveau passage sur la Souris.

IV. — Une immunité partielle s'installe chez les Rats guéris d'une première infection, leur permettant de résister efficacement à des réinfections ultérieures.

V. — En choisissant un liquide visqueux tel que le Subtosan, et en l'amenant à une densité voisine de celle des hématies parasitées, on peut séparer ces dernières des hématies normales plus denses.

VI. — Il est possible d'obtenir, par digestion trypsique des hématies parasitées ainsi isolées, un antigène constitué presque exclusivement de *Plasmodium*.

VII. — La réaction de fixation du complément pratiquée avec cet antigène a permis de révéler l'existence d'anticorps spécifiques dont le taux est très élevé chez les Rats hyper-immunisés.

VIII. — A part un cas douteux, les quelques réactions effectuées avec cet antigène sur des sérums humains de paludéens ont donné des résultats négatifs.

Vu :
Pour le Doyen :
L'Assesseur,
R. SIGALAS.

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
R. SIGALAS.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 28 Mars 1953.
Le Recteur,
E. DELAGE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abrami (P.) & Sevenet (G.). — *Bull. Soc. Méd. Hôp. Paris*, mars 1917, 519-534.
2. Baldi (A.). — *Riv. di Malariologia*, 1950, **29**, 345-356.
3. Baldi (A.). — *Riv. di Malariologia*, 1952, **31**, 41-52.
4. Berghe (Van den), Vincke (I.) & Chardome (M.). — *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 1950, **30**, 79-82.
5. Berliner (R. W.), Kennedy (T. J.) & Bigelow (F. S.). — *J. Clin. Invest. U. S. A.*, 1948, **27**, 134-137.
6. Black (R. H.). — *Ann. Trop. Med. and Parasitology*, 1951, **45**, 127-136.
7. Black (R. H.). — *Ann. Trop. Med. and Parasitology*, 1951, **45**, 199-206.
8. Brumpt (E.). — Précis de Parasitologie. Masson & C^ie^, édit.
9. Carlson (M. J.), Mueller (M. G.) & Bissell. — *J. Lab. and Clin. Med.*, 1946, **31**, 677-686.
10. Chorine (V.). — *Arch. Inst. Prophyl.*, 1938, **10**, 202-216.
11. Corradetti (A.). — *Ist. Sup. Sanita Rendic. Ital.*, 1951, **14**, 457-483.
12. Corradetti (A.) & Verolini (F.). — *Ist. Sup. Sanita Rendic. Ital.*, 1951, **14**, 584-605.
13. Cunningham, Hahn & Mc Kee. — *J. Exp. Med.*, 1950, **91**, 599.
14. De Blasi (D.). — *Ann. d'Igiene Sper.*, 1907.
15. Deschiens (R.) & Lamy (L.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1951, **44**, 405-409.
16. Dulaney (A. D.) & Morrison (D. B.). — *Amer. J. Trop. Med.*, 1944, **24**, 323-326.
17. Dulaney (A. D.) & Stratman-Thomas (W. K.). — *J. Immunol.*, 1940, **39**, 247-255.
18. Durand (P.) et Mathis (M.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1950, **231**, 633.
19. Durand (P.) & Mathis (M.). — LXX^e^ Congrès Assoc. franç. pour l'Avancement des Sciences, Tunis, mai 1951.
20. Fabiani (G.), Clausse (M^lle^ J.) & Fulchiron (G.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1952, **235**, 274-276.
21. Fabiani (G.), Clausse (M^lle^ J.) & Fulchiron (G.). — *C. R. Soc. Biologie*, 1952, **146**, 1580-1584.

22. Fabiani (G.), Clausse (M^lle J.) & Fulchiron (G.). — *C. R. Soc. Biologie*, 1952, **146**, 1584-1586.
23. Fabiani (G.), Clausse (M^lle J.) & Fulchiron (G.). — *C. R. Soc. Biologie*, 1952, **146**, 1587-1589.
24. Fabiani (G.), Grellet (P.), Vargues (R.), Fulchiron (G.) & Verain (M^me). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 721-737.
25. Fabiani (G.), Izzo (M^lle M. A.) & Grellet (P.). — *C. R. Soc. Biologie*, 1951, **145**, 1301.
26. Fabiani (G.), Vargues (R.), Fulchiron (G.) & Grellet (P.). — *C. R. Soc. Biologie*, 1951, **145**, 1156.
27. Fabiani (G.), Vargues (R.), Fulchiron (G.), Grellet (P.) & Verain (M^me A.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1951, **44**, 580-591.
28. Fabiani (G.), Vargues (R.), Grellet (P.) & Clausse (M^lle J.). — *C. R. Soc. Biologie*, 1951, **145**, 1133.
29. Fabiani (G.) & Vargues (R.). — *C. R. Soc. Biologie*, 1951, **145**, 1523-1525.
30. Fabiani (G.) & Vargues (R.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1951, **233**, 502-504.
31. Ferrebee (J. W.) & Geiman (Q. M.). — *J. Infect. Dis.*, 1946, **78**, 173-179.
32. Findlay (G. M.) & Howard (E. M.). — *Nature*, 1952, **29**, 547.
33. Freund (J.), Thomson (K. J.), Sommer (H. E.), Walter (A. W.) & Pisani (T. M.). — *Amer. J. Trop. Med.*, 1948, **28**.
34. Galliard (H.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1949, **42**, 431.
35. Galliard (H.) & Lapierre (J.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1950, **43**, 317-323.
36. Galliard (H.) & Lapierre (J.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1950, **43**, 410-412.
37. Galliard (H.) & Lapierre (J.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1951, **44**, 185-194.
38. Gasparrini (A.). — Cité par Servanton (62).
39. Grellet (P.). — Thèse de Médecine, Alger, 1951.
39 bis. Halpern (B. N.) & Pacaud (A.). — *C. R. Soc. Biologie*, 1951, **145**, 1465-1466.
40. Heidelberger (M.), Mayer (M. M.) & Demarest (C. R.). — *J. Immunol.*, 1946, **52**, 325-330.
41. Henry (A. F. X.). — *Bull. Inst. Pasteur*, 1927, 702.
42. Horowitz-Wlassowa (L.). — Cité par Servanton (62).
43. James (S.). — Cité par Grellet (39).
44. Levaditi (C.) & Vaisman (A.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1950, **43**, 696.
45. Lippincott (W.), Gordon (H.), Hesselbrock (W. M.) & Marble (A.). — *J. Clin. Invest.*, 1945, **24**, 362.
46. Lo Monicho & Panichi. — Cité par Mannoni (47 bis).
47. Lowell (F.), Coggeshall (L. T.), Monroe (D.) & Eaton (M. D.). — *J. Exp. Med.*, 1938, **67**.

47 bis. Mannoni (J.). — Thèse de Médecine, Paris, 1936.
48. Manson. — Cité par Brumpt (8).
49. Massa (M.). — *Pathologica*, 1929, **21**, 18-23.
50. Mercado (T. I.) & Coatney (G. R.). — *J. Nation. Malaria Soc. U. S. A.*, 1951, **10**, 356-365.
51. Mercado (T. I.) & Coatney (G. R.). — *J. Parasitology U. S. A.*, 1951, **37**, 479-482.
52. Pewny (W.). — Cité par Servanton (62).
53. Philips (A.) & Van Slyke (D.). — *J. Biol. Chem.*, 1950, **183**, 305-330.
54. Rao (R. R.), Ramaswamy (A. S.) & De (N. N.). — *Indian Med. Gaz.*, 1951, **86**, 147-148.
55. Riel (V.). — *Ann. I. P. Fr.*, 1950, **79**, 772-776.
56. Rodhain (J.). — *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 1951, **31**, 289-296.
57. Schneider (J.), Decourt (P.) & Montezin (G.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1949, **42**, 449.
58. Schneider (J.) et Montezin (G.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1950, **43**, 144-148.
59. Schneider (J.) & Schneider (C.). — *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1950, **43**, 324-332.
60. Sergent (E.). — *Arch. I. P. d'Algérie*, 1950, **28**, 429-440.
61. Sergent (E.) & Poncet (Mme A.). — *Arch. I. P. d'Algérie*, 1950, **28**, 323-334.
62. Servanton (P.). — Thèse de Médecine, Bordeaux, 1934.
63. Taliaferro (W. H.), Taliaferro (L. G.) & Fisher (B.). — *J. Prev. Med.*, 1927.
64. Thomson (J. G.). — *British Medical Journal*, 1918.
65. Thomson (K. J.), Freund (J.), Sommer (H. E.) & Walter (A. W.). — *Amer. J. Trop. Med.*, 1947, **27**, 79.
66. Vargues (R.). — *C. R. Soc. Biologie*, 1951, **145**, 1134.
67. Vargues (R.), Fabiani (G.) & Fulchiron (G.). — *C. R. Soc. Biologie*, 1951, **145**, 1298.
68. Vargues (R.) & Fabiani (G.). — *C. R. Soc. Biologie*, 1951, **145**, 1519-1520.
69. Vargues (R.) & Fabiani (G.). — *C. R. Soc. Biologie*, 1951, **145**, 1521-1523.
70. Vincke (I. H.) & Bulcke (V. D.). — *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 1949, **29**, 537-543.
71. Vincke (I. H.) & Bulcke (V. D.). — *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 1949, **29**, 545-548.
72. Vincke (I. H.) & Lips (M.). — *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 1948, **28**, 97.
73. Ziemann (H.). — Cité par Servanton (62).

TABLE DES MATIÈRES

Pages

AVANT-PROPOS 7

INTRODUCTION 9

PREMIÈRE PARTIE

Etude expérimentale du « Plasmodium Berghei »

HISTORIQUE 15

TECHNIQUES D'ÉTUDE 16

DIFFÉRENTES VOIES D'INOCULATION 18

CHAPITRE PREMIER. — LA PÉRIODE PRÉPATENTE 21

CHAPITRE II. — EVOLUTION DE L'INFECTION CHEZ LE RAT 24

I. — Modifications qualitatives 24

II. — Modifications quantitatives 30

CHAPITRE III. — EVOLUTION DE L'INFECTION CHEZ LA SOURIS. 36

CHAPITRE IV. — AUGMENTATION ARTIFICIELLE DE LA PARASITÉMIE 38

Augmentation artificielle de la réticulocytose sanguine. 38

Essais d'inhibition du système réticulo-endothélial 39

CHAPITRE V. — VARIATIONS DE LA VIRULENCE DE LA SOUCHE. 43

CHAPITRE VI. — IMMUNITÉ 46

Caractères de cette immunité 46

Rechutes parasitaires 46

Virulence du sang après la guérison clinique spontanée. 47

Réinoculations 47

Essais d'immunisation passive *in vitro* 48

Influence de la rate 49

Conclusions de la première partie 50

DEUXIÈME PARTIE

Etude antigénique du « Plasmodium Berghei »

Etude antigénique du « plasmodium Berghei » 53

Chapitre premier. — Détermination de la densité des globules rouges parasités 54

Préparation des solutions 54

Chapitre II. — Préparation de l'antigène 58

Prélèvement de sang 58

Elimination du plasma et des globules blancs. – Séparation des hématies parasitées 59

Chapitre III. — Réaction de fixation du complément 65

Titrage préalable du sérum hémolytique 65

Titrage du jour du complément 66

Réaction proprement dite 67

Résultats. — Variations du taux des anticorps 69

Variations alexiques 72

Utilisation de notre antigène au séro-diagnostic du paludisme humain 72

Conclusions générales 75

Bibliographie 77

Bordeaux. — Imp. E. Drouillard, place de la Victoire, 3.